LYMPHOZYTEN – AKTIVIERENDE WIRKUNG BAKTERIELLER ZELLWANDKOMPONENTEN UND IHRER SYNTHETISCHEN ANALOGA IN VIVO UND IN VITRO

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
SIGRID KÖHL
aus Stuttgart

1983

LYMPHOZYTEN-AKTIVIERENDE WIRKUNG BAKTERIELLER ZELLWANDKOMPONENTEN UND IHRER SYNTHETISCHEN ANALOGA IN VIVO UND IN VITRO

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt
von

Sigrid Köhl

aus Stuttgart
1983

Tag der mündlichen Prüfung : 11. Mai 1983

Dekan : Prof. Dr. K. P. Hadeler

1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. G. Bessler

2. Berichterstatter : Prof. Dr. V. Braun

UNIV. LEIDEN BIBL.

Meinen Eltern
Marta und Walter Köhl
gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie II, der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Bessler durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Bessler für die Überlassung des Themas sowie die großzügige Unterstützung und gute Betreuung bei der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. V. Braun danke ich herzlich für sein Interesse an der Arbeit. Durch die freundliche Überlassung der apparativen Einrichtungen wurde die Durchführung der Arbeit wesentlich erleichtert.

Mein besonderer Dank gilt Dr. R.B. Johnson, der mit steter Hilfsbereitschaft und Diskussion wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle I und II, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima danken.

Für die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung einiger Experimente gilt mein Dank Frau Marianne Cox und Frau Karin Stäb.

Bei Herrn Manfred Reich möchte ich mich herzlich für die unermüdliche Geduld beim Anfertigen der Arbeit bedanken.

Verwendete Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat.
APS	Ammoniumperoxodisulfat.
BSA	Rinderserumalbumin.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure.
FCS	Fötales Kälberserum.
FITC	5-S-Isothiocyanato-flourescein.
FLP	Freies Lipoprotein.
LP	Lipoprotein.
LPS	Lipopolysaccharid.
MEM	Minimal essential medium.
OD	Optische Dichte.
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung.
PEC	Peritonealzellen.
PFC	Plaque forming cells.
PPD	Purified protein derivative.
SBRC	Schafserythrozyten.
SDS	Natriumdodecylsulfat.
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin.
TNP	Trinitrophenol.
TPP	Tripalmitoylpentapeptid.
TPC	Tripalmitoylcystein.
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan.
Triton	Triton X-100 (p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenoxypolyethylenglycol (9,5 Ethylenglycol-Reste)).

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	11
	Zielsetzung und Problemstellung	19
2.	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1.	Isolierung von freiem Lipoprotein	20
2.1.1.	Anzucht der Bakterien	20
2.1.2.	Bakterienaufschluß	20
2.1.3.	Abtrennung des Mureins	21
2.1.4.	Phenolextraktion	22
2.1.5.	Fraktionierte Acetonfällung	23
2.2.	Analytische Methoden	23
2.2.1.	Proteinbestimmung	23
2.2.2.	Analytische Polyacrylamidgelelektrophorese	24
2.2.3.	Färbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blue	26
2.3.	Methoden zur Untersuchung der biologischen Wirkung von Mitogenen auf Leukozyten in vitro	26
2.3.1.	Isolierung verschiedener Zellpopulationen	26
2.3.1.1.	Präparation von Milzlymphozyten	27
2.3.1.2.	Präparation von Thymozyten	28
2.3.1.3.	Präparation von Lymphknotenzellen	28
2.3.1.4.	Isolierung von Lymphozyten des peripheren Bluts	28
2.3.1.5.	Vitalitätsfärbung zur Bestimmung der Zellzahlen	28
2.3.2.	Stimulationsexperimente in vitro	29
2.3.2.1.	Vorbereitung der Mitogene	29
2.3.2.2.	Stimulationstests mit Lymphozyten aus der Milz, dem Thymus und den Lymphknoten	29
2.3.2.3.	Stimulationstests mit Lymphozyten des peripheren Bluts	30

2.4.	Methoden zur Untersuchung der biologischen Wirkung von Mitogenen auf Leukozyten in vivo	31
2.4.1.	In vivo-Immunisierung von Mäusen	31
2.4.2.	Präparation von Milzlymphozyten in vivo immunisierter Tiere	31
2.4.3.	Syntheseraten in vivo immunisierter Tiere	31
2.4.4.	Untersuchung der Antikörperproduktion von B-Lymphozyten nach in vivo-Stimulation	32
2.4.4.1.	Absorption von Komplement	32
2.4.4.2.	Hämolytischer Plaquetest mit TNP-beschichteten Erythrozyten	33
2.4.4.3.	Hämolytischer Plaquetest mit unbeschichteten Erythrozyten	34
2.4.4.4.	Hämolytischer Plaquetest mit Protein A-beschichteten Erythrozyten	34
2.5.	Methoden zur Untersuchung der Makrophagen- und Monozytenaktivierung	35
2.5.1.	Makrophagenaktivierung in vitro	35
2.5.1.1.	Immunisierung mit Thioglycollat	35
2.5.1.2.	Präparation von Peritonealmakrophagen	35
2.5.1.3.	5'-Nucleotidasetest	35
2.5.2.	Monozytenaktivierung in vivo	38
2.5.2.1.	Beseitigung von Kohlenstoff aus dem Blut immunisierter Tiere	38
2.6.	Methoden zur Trennung von B- und T-Lymphozyten	39
2.6.1.	Trennung von B- und T-Lymphozyten mit anti-Theta- und anti-Immunglobulinseren und mit Komplement	39
2.6.2.	FITC-Markierung von Antiseren	40
2.6.3.	Fluoreszenzmarkierung von Zellen	40

3.	ERGEBNISSE	41
3.1.	Isolierung von freiem Lipoprotein	41
3.1.1.	Anzucht der Bakterien	41
3.1.2.	Isolierung von freiem Lipoprotein	41
3.1.3.	Gelelektrophoretische Untersuchung von FLP	42
3.2.	Mitogene Aktivität von Lipoprotein und seinen synthetischen Analoga in vitro	42
3.2.1.	In vitro-Aktivierung von B-Lymphozyten durch Lipoprotein und seine synthetischen Analoga	43
3.2.1.1.	In vitro-Aktivierung von Milzzellen verschiedener Mäusestämme durch Lipoprotein, Lipopolysaccharid und Concanavalin A	43
3.2.1.2.	In vitro-Aktivierung von Milzzellen verschiedener Mäusestämme durch die synthetischen Analoga	48
3.2.2.	In vitro-Aktivierung von T-Lymphozyten durch Lipoprotein und seine synthetischen Analoga	51
3.2.2.1.	In vitro-Aktivierung von Thymozyten durch E. coli Lipoprotein, E. coli Lipopolysaccharid und Concanavalin A	52
3.2.2.2.	In vitro-Aktivierung von Thymozyten durch die synthetischen Analoga	53
3.2.3.	In vitro-Aktivierung von Lymphknotenzellen durch Escherichia coli Lipoprotein und Tripalmitoylpentapeptid	55
3.2.4.	In vitro-Aktivierung von Lymphozyten des peripheren Bluts von Balb/c-Mäusen durch E. coli Lipoprotein und seine synthetischen Analoga	56
3.3.	Biologische Aktivität von Lipoprotein und seinen synthetischen Analoga in vivo	59
3.3.1.	Abhängigkeit der mitogenen Antwort von der Dosis des in vivo verabreichten Materials	60

3.3.1.1.	Dosis-Wirkungskurve für Lipoprotein aus Escherichia coli bei der Stimulation in vivo	60
3.3.1.2.	Dosis-Wirkungskurve von Tripalmitoyl-pentapeptid in vivo	63
3.3.2.	Aktivierung von B-Lymphozyten durch Lipoprotein und seine synthetischen Analoga bei verschiedenen Mäusestämmen in vivo	66
3.3.2.1.	Stimulation von Balb/c-Lymphozyten	67
3.3.2.2.	Polyklonale Stimulation von C3H/HeJ-Lymphozyten	69
3.3.2.3.	Polyklonale Stimulation der Milzzellen thymusloser Tiere	71
3.3.3.	Kinetik der polyklonalen Immunantwort in vivo	73
3.3.3.1.	Kinetik der polyklonalen Antwort auf E. coli Lipoprotein	73
3.3.3.2.	Kinetik der polyklonalen Antwort bei Tripalmitolylpentapeptid	77
3.3.4.	Vergleich der primären und sekundären Immunantworten	79
3.3.4.1.	Restimulation von Lymphozyten in vitro	80
3.3.4.1.1.	Sekundäre Immunantwort bei Balb/c-Mäusen	80
3.3.4.1.2.	Sekundäre Immunantwort bei thymuslosen Mäusen	82
3.3.4.1.3.	Sekundäre Immunantwort nach Auftrennung der Milzzellen in Einzelzellsuspensionen bei in vivo immunisierten Tieren	84
3.3.4.2.	Restimulation von Lymphozyten in vivo	86
3.3.4.2.1.	Sekundäre Immunantwort auf Lipoprotein	86
3.3.4.2.2.	Sekundäre Immunantwort auf Tripalmitoyl-pentapeptid	89
3.3.5.	Wirkung von Lipoprotein und Tripalmitoyl-pentapeptid auf Makrophagen	90
3.3.5.1.	Aktivierung von Makrophagen in vitro	91
3.3.5.2.	Aktivierung von Makrophagen in vivo	91

4.	DISKUSSION	94
4.1.	Lipoprotein und seine synthetischen Analoga als Mitogene in vitro	94
4.2.	Lipoprotein und seine synthetischen Analoga als Mitogene in vivo	96
4.3.	Kinetik der Stimulation in vivo	98
4.4.	Regulation der in vivo-Antwort auf bakterielle Mitogene	100
4.5.	Aktivierung von Makrophagen durch Lipoprotein und seine synthetischen Analoga	104
5.	ZUSAMMENFASSUNG	107
6.	LITERATUR	109
7.	LEBENSLAUF	121

1. EINLEITUNG

Vertebraten besitzen ein hochentwickeltes System, das ihnen erlaubt, die Integrität und Individualität ihres Organismus zu erhalten. Die Aktivitäten dieses Immunsystems sind primär auf die Eliminierung von Fremdkörpern, wie z.B. eindringenden Viren und Bakterien, aber auch gegen veränderte - und damit als fremd erkannte - körpereigene Zellen gerichtet. In der Abwehr von Infektionen liegt die lebenswichtige Bedeutung des Immunsystems für den Organismus. Hierbei sind vor allem zwei Eigenschaften wichtig, nämlich die Fähigkeit, Selbst und Nicht-Selbst zu unterscheiden und ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen, das nicht vererbbar ist. Jede Generation muß also von neuem lernen (1, 2).

Neben vorwiegend unspezifisch arbeitenden Abwehrmechanismen, an denen zur Phagozytose und Pinozytose befähigte Zellen (Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) (3, 4, 5), sowie lösliche Faktoren wie z.B. Lysozym, Interferon, bakterizide Stoffe und das Komplementsystem (2, 6), beteiligt sind, besitzt der Säugetierorganismus ein äußerst effizientes Immunsystem, durch das eine spezifische Immunreaktion gewährleistet ist.

Die spezifische Immunreaktion beruht auf einem kooperativen System, das sich im wesentlichen aus zwei Klassen von Lymphozyten, den B- und T-Lymphozyten und Zellen der myeloiden Reihe, den Makrophagen oder Monozyten, zusammensetzt.

Ein Hauptcharakteristikum der aus dem Knochenmark stammenden B-Zellen ist ihre Fähigkeit zur Immunglobulinsekretion. Jede Zelle ist genetisch so determiniert, daß sie nur eine einzige Spezifität von Rezeptormolekülen, den Immunglobulinen, auf ihrer Membran exprimieren kann, die zur Bindung von immunogen wirkenden Makromolekülen, den Antigenen, in der Lage sind. Bindet ein Antigen fest an diese Oberflächenrezeptoren, beginnt diese

Zelle rasch zu proliferieren, woraus schließlich ein "Klon" von Lymphozyten resultiert. Jede Zelle eines Klons ist durch denselben Rezeptor wie die Ausgangszelle gekennzeichnet und ist nach der Ausdifferenzierung zur Plasmazelle mit der Fähigkeit zur Sekretion einer modifizierten Form des Rezeptorproteins, dem Antikörper, begabt. Die humorale Immunantwort auf ein gegebenes Antigen ist somit durch die Produktion von Antikörpern mit einer gegen ein exogenes Antigen gerichteten Struktur definiert (1, 2).

Der immensen Anzahl potentiell immunogen wirkender Verbindungen muß eine entsprechende Menge an Antikörpern gegenüberstehen. Die enorme Antikörpervielfalt erhebt die Frage nach dem genetischen Ursprung dieser Proteine. Mittlerweile scheint gesichert, daß nur eine begrenzte Anzahl an Genen für die variablen Regionen der Immunglobuline im Genom embryonaler Zellen kodiert ist und daß die Immunoglobulindiversität durch Rekombinations- und somatische Mutationsprozesse erreicht wird (7, 8, 9).

Da jede B-Zelle nur einen einzigen Typus funktioneller Schwer- und Leichtketten synthetisieren kann, muß ein Mechanismus die Exprimierung der Gene des zweiten homologen Chromosoms supprimieren. Man spricht hierbei von "allelic exclusion" (10).

T-Lymphozyten bilden die zelluläre Grundlage der zellvermittelten Immunität, die bei Infektionen mit Bakterien und Viren, bei Abstoßungsreaktionen gegen Transplantate, bei einigen Formen der Allergie und bei Autoimmunerkrankungen von Bedeutung ist. Diese Immunreaktionen werden durch sensibilisierte T-Lymphozyten vermittelt, die in vitro wie in vivo mit dem entsprechenden Antigen reagieren, das die ursprüngliche, für die Entwicklung und Differenzierung der sensibilisierten Zellen notwendige Stimulation auslöste.

Über die Natur des T-Zellrezeptors ist nichts genaueres bekannt. Wahrscheinlich handelt es sich nicht um Immunglobulinmoleküle. Es gibt allerdings Anhaltspunkte

dafür, daß der T-Zellrezeptor ein Genprodukt der Loci für Schwerketten von Antikörpermolekülen sein könnte (11, 12).

Für die Bildung und Reifung immunkompetenter T-Lymphozyten ist ein intakter Thymus Voraussetzung. Aus dem hämatopoetischen Organ wandern Vorläuferzellen in die Thymusrinde ein und reifen dort zu Thymozyten aus. Im Verlauf dieses Reifungsprozesses während ihrer Passage durch den Thymus erfahren Thymuslymphozyten charakteristische Veränderungen, die sich im Auftreten neuer Oberflächenantigene und neuer funktioneller Eigenschaften äußert.

Die genetisch festgelegten Aufgaben der T-Lymphozyten sind komplex und umfassen immunregulatorische Eigenschaften sowie die Fähigkeit, spezifische Antigene zu erkennen und Effektorfunktionen auszuüben. T-Lymphozyten proliferieren nach Kontakt mit löslichen Antigenen und sind verantwortlich für eine zytotoxische Killeraktivität bei zellvermittelter Lympholyse (13). Sie produzieren eine Reihe löslicher Faktoren (14, 15), die ihrerseits wieder andere Zellpopulationen beeinflussen können. Ihre bedeutendste Eigenschaft jedoch zeigen T-Zellen bei allen regulatorischen Interaktionen im Immunsystem. Hierzu gehören Helfer- und Suppressoraktivitäten (11, 12, 16).

Alle Zellen des Immunsystems können über komplexe Wechselwirkungsmechanismen miteinander kommunizieren. Erst durch den Kontakt der Zellen untereinander über Oberflächenstrukturen wird eine feine Regulation der Immunantwort auf Antigene möglich.

B-Lymphozyten können Antigen zwar an ihre Immunglobulinrezeptoren binden, jedoch genügt zumeist diese Interaktion nicht, um eine vollständige Aktivierung und Differenzierung der Zellen zu induzieren. Vielmehr scheinen T-Lymphozyten Antigen in Verbindung mit Ia-Determinanten auf Makrophagen zu erkennen, die das Antigen auf ihrer Oberfläche wahrscheinlich in modifizierter und immunoge-

ner Form präsentieren (17, 18). Dieser Kontakt der beiden Zellen führt zu einer Aktivierung der Helfer-T-Zelle und zur Produktion von Helferfaktoren (19, 20). Aktivierte T-Lymphozyten interagieren dann über Antigen und Ia-Determinanten mit der B-Zelle, was zu ihrer Aktivierung führt. Im wesentlichen werden Immunreaktionen durch stimulierende und suppressive Einflüsse in Form von Helfer- und Suppressorzellen reguliert. Suppressorzellen spielen bei Immunreaktionen wie DTH (delayed type hypersensitivity), Kontaktallergien, Antikörperantworten auf T-Zell-abhängige bzw. T-Zell-unabhängige Antigene eine entscheidenden Rolle (21). Obwohl normalerweise Lymphozyten der T-Zell-Linie das Hauptkontingent suppressiver Zellen stellen, konnten auch bei Monozyten bzw. Makrophagen (22) sowie bei B-Zellen (23) suppressive Eigenschaften nachgewiesen werden.

Zellen des Immunsystems müssen sich gegenseitig erkennen, um miteinander zu kommunizieren und um regulatorische Aufgaben wahrnehmen zu können. Gemeinsame idiotypische Determinanten auf der Zelloberfläche von B- und T-Lymphozyten stellen Strukturen dar, die zur Verständigung der Zellen benutzt werden können. Die idiotypische Determinante ist eine antigene Struktur auf dem Antikörper. Sie hängt von seiner Spezifität ab. Nach Jerne (24) stellt das Immunsystem ein Netzwerk von Antikörpern und Rezeptoren dar, die Immunglobuline bzw. Lymphozyten erkennen können und ihrerseits von ihnen erkannt werden. So wird bei einer Immunantwort gegen ein exogenes Antigen eine idiotypische Determinante exprimiert, die wiederum als Antigen wirken und eine anti-idiotypische Reaktion auslösen kann, um so die ursprüngliche Immunreaktion zu regulieren. Wichtigste Voraussetzung für diese Art der Regulation ist also die dualistische Funktion der Idiotypen, die sowohl antigenische als auch Antikörper-Aufgaben wahrnehmen können. Eine idiotypisch-anti-idiotypische Wechselwirkung kann sich in einer Supprimierung oder Stimulation der Immunreaktion äußern (25, 26).

Die geringe Anzahl reaktiver B-Zellen (nur ca. 0.1% aller B-Zellen können ein bestimmtes Antigen binden und dadurch aktiviert werden (27)) erschwert die Untersuchungen der Regulations- und Aktivierungsmechanismen von Lymphozyten.

Mit der Entdeckung von Substanzen, die ein breites Spektrum von B-Lymphozyten unabhängig von ihrer Spezifität zur Proliferation und zur Antikörpersynthese induzieren, wurden die Untersuchungen zur Lymphozytenstimulation wesentlich erleichert. Diese Verbindungen werden unter dem Begriff "Mitogene" bzw. "B-Zell-Aktivatoren" zusammengefaßt. Dies sind Substanzen, die B-Zellen zahlreicher Spezifitäten zur Teilung und/oder Antikörpersynthese stimulieren. Die Aktivierung der Zellen hängt vom genetisch festgelegten Programm der B-Zelle und von ihrem Differenzierungsstatus ab. Die Antwort einer einzelnen Zelle kann folglich entweder nur die Induktion der Immunglobulinproduktion ohne DNA-Synthese oder nur eine Erhöhung der Teilungsrate sein. Die größte Anzahl der Zellen wird jedoch sowohl zur DNA- als auch Antikörpersynthese stimuliert. Da die Aktivierung polyklonaler Natur ist, können Immunglobulinrezeptoren an der Zelloberfläche nicht für die Initiierung einer Stimulation verantwortlich sein. Coutinho und Möller postulierten deshalb, daß B-Zellen durch ein unspezifisches Signal aktiviert werden, das durch Oberflächenstrukturen vermittelt wird, die nicht zur Klasse der Immunglobuline gehören. Die Aufgabe der Immunglobulinrezeptoren besteht lediglich darin, das Antigen auf der Oberfläche der Zellen zu fokussieren und zu konzentrieren. Das eigentliche Signal zur Induktion einer humoralen Immunantwort erfolgt dann über eine Interaktion mit regulatorischen T-Zellen oder durch die Bindung eines Mitogens an diese Rezeptoren (28).

Nach Bretscher und Cohn werden dagegen zwei Signale zur Induktion einer Immunantwort benötigt. Die Bindung eines Antigens an die Immunglobulinrezeptoren einer sensitiven Zelle wirkt als erstes Aktivierungssignal.

Erst durch die Interaktion mit einer kooperierenden T-Helferzelle kann eine humorale Immunantwort induziert werden. Die B-Zellaktivierung bleibt aus, wenn das zweite Signal durch eine Suppressorzelle vermittelt wird, oder ganz fehlt (29).

Es wurden verschiedene Klassen von Mitogenen beschrieben, nämlich solche, die entweder nur T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten stimulieren und Mitogene, die sowohl auf B- als auch T-Lymphozyten wirken. Lipopolysaccharid (LPS), das nur B-Lymphozyten aktivieren kann, induziert bei 30% aller Lymphozyten eine Differenzierung zur antikörpersekretierenden Zelle (30).

Eine Vielzahl mitogen wirkender Substanzen ist auf der äußeren Membran von Bakterien lokalisiert. Die bakterielle Zellwand stellt eine Struktur dar, die von beträchtlicher Bedeutung für höhere Organismen ist. Ihr komplexer antigenischer Aufbau wird durch den Wirtsorganismus zur Induktion von Immunantworten eingesetzt, die ihm einen spezifischen Schutz gegen spätere bakterielle Infektionen bietet.

Die Zellhülle gram-negativer Bakterien ist aus drei Schichten aufgebaut. Zuinnerst liegt die cytoplasmatische Membran. Sie beherbergt die Systeme des aktiven Transports, der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung. In ihr liegen weiterhin viele Enzyme zur Synthese von Membranbestandteilen wie Phospholipiden, Lipopolysacchariden und dem Murein. Letzteres umschließt als zweite Schicht die Cytoplasmamembran in Form eines einschichtigen, monomolekularen Sacculus. Die Mureinschicht gibt der Zelle mechanische und osmotische Stabilität. Ihr unmittelbar aufgelagert liegt die äußere Membran. Sie schließt die Zelle nach außen ab und ist wie die innere Membran aus einer Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen aufgebaut. In ihr findet man auch das Lipopolysaccharid. Die äußere Membran besteht zu ungefähr 50% aus Protein (31). Hiervon entfällt der allergrößte Teil auf 5 Proteinspecies, die sogenannten 'major outer membrane proteins'. Diese haben Struktur-erhalten-

de Funktionen und dienen der festen Verbindung zwischen der äußeren Membran und dem Murein (32). Zu den Hauptproteinen der äußeren Membran von Escherichia coli gehören Protein I und II* (33), sowie das von Braun beschriebene Lipoprotein (34), das möglicherweise die Stabilisierung der äußeren Membran übernimmt. Kamino und Nikaido zeigten, daß die Hauptproteine von Escherichia coli und Salmonella thyphimurium auf der Zelloberfläche lokalisiert sind (35). Neben diesen Hauptproteinen der äußeren Membran kommen ungefähr 40 weitere Proteine vor, die unter anderem die Aufnahme spezieller Verbindungen vermitteln.

Eine Vielzahl bakterieller Zellwandstrukturen übt regulatorische Funktionen auf das Immunsystem höherer Organismen aus. Besonders Lipopolysaccharid und Lipoprotein gram-negativer Bakterien haben Einfluß auf immunologische Reaktionen im Verlauf von Infektionen. Der Lipid A-Anteil von LPS wirkt als Mitogen auf B-Lymphozyten (36), aktiviert Makrophagen (37) und vermittelt eine unspezifische Resistenz gegen bakterielle Infektionen (38). Darüberhinaus hat der Lipid A-Teil adjuvante Eigenschaften (39). LPS spielt damit eine bedeutende Rolle bei der Beeinflussung der Wirts-Parasitenbeziehung bei Infektionen. Andere Proteine mikrobiellen Ursprungs wie PPD (purified protein derivative) von Mycobacterium tuberculosis (40), Protein A von Staphylococcus aureus (41) und Flagellin von Salmonella adelaide (42) zeigen dem Lipopolysaccharid verwandte Eigenschaften.

Das Immunsystem diskriminiert normalerweise streng zwischen Selbst und Nicht-Selbst, so daß gewöhnlich Immunantworten nur gegen körperfremde Komponenten gerichtet sind. Diese Unterscheidung basiert wahrscheinlich nicht, wie von Burnet 1959 postuliert, auf einer Elimination autoreaktiver B-Zellen, sondern wird vielmehr durch regulatorische Mechanismen von T-Zellen vermittelt.

Da polyklonale Aktivatoren B-Zellen jeglicher Spezifität zur Differenzierung induzieren können, besteht die potentielle Gefahr, autoreaktive Klone mit Rezeptoren für körpereigene Determinanten unter Umgehung der T-Lymphozytenregulation zu stimulieren (43, 44). Primi konnte zeigen, daß nach in vivo-Injektion von Lipopolysaccharid Autoantikörper gegen ein weites Spektrum zellulärer und löslicher Autoantigene auftraten (45). Autoantikörper wurden auch nach in vitro-Kultivierung von Milzzellen in Gegenwart verschiedener Mitogene nachgewiesen (46). Klinische Bedeutung erlangt die Bildung dieser Autoantikörper im Verlauf massiver Infektionen mit endotoxinproduzierenden Bakterien. Bei Patienten, die an Multipler Sklerose erkrankt waren, wurden im zentralen Nervensystem Antikörper produziert, die mit einer Vielzahl viraler Proteine reagieren. Es wird angenommen, daß die Antikörperproduktion bei Multipler Sklerose durch mitogen wirkende Substanzen hervorgerufen wurde. Auch die als rheumatoide Faktoren bekannten IgM-Moleküle, die mit autologem Immunglobulin der Klasse IgG Immunkomplexe bilden, könnten durch eine polyklonale B-Zellaktivierung hervorgerufen worden sein (47, 48). Wie das Auftreten solcher Antikörper mit rheumatischen Erkrankungen in Beziehung steht, ist noch ungeklärt.

Zielsetzung und Problemstellung

Oberflächenkomponenten von Bakterien stellen häufig mitogen wirkende Strukturen dar, die Lymphozyten *in vitro* zur Proliferation und Antikörpersynthese induzieren (34, 41). Es ist nur wenig über die Bedeutung mitogen wirkender Substanzen *in vivo* bekannt. Zwar wurde die Beteiligung polyklonaler Aktivatoren bei bestimmten klinisch manifesten Symptomen beschrieben, jedoch ist nichts Genaues über die Wirkungsweise dieser Verbindungen *in vivo* bekannt.

Inzuchtstämme von Mäusen bieten im Gegensatz zum humanen System den Vorteil, genetisch identisches Material zu liefern. Deshalb sollten in dieser Arbeit anhand eines Tiermodells die im lebenden Organismus ablaufenden Veränderungen nach Kontakt eines Individuums mit mitogenen Substanzen untersucht werden und mit den *in vitro* erhaltenen Ergebnissen verglichen werden. Es sollten Dosis-Wirkungskurven und Kinetiken der polyklonalen B-Zellantwort erstellt werden. Außerdem sollte die Aktivierung einzelner Zellpopulationen (B-, T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten) nach *in vivo*-Applikation polyklonaler B-Zellaktivatoren untersucht werden.

Um näheres über die für die Stimulation notwendige minimale Struktur dieser Substanzen zu erfahren, sollte natives Lipoprotein aus der Zellwand von *Escherichia coli* isoliert und *in vivo* getestet werden. Diese Ergebnisse sollten mit der *in vivo*-Aktivierung durch zwei synthetisch dargestellte Lipoproteinanaloga verglichen werden. Diese Verbindungen bieten vor allem den Vorteil, daß sie ein absolut sauberes und gut charakterisiertes Arbeitsmaterial darstellen. Erste Untersuchungen zur Klärung regulatorischer Vorgänge im lebenden Organismus nach bakteriellen Infektionen sollten durchgeführt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Isolierung von freiem Lipoprotein (49)

2.1.1. Anzucht der Bakterien

Für die Isolierung von freiem Lipoprotein (FLP) wurde der Bakterienstamm Escherichia coli B/r verwendet. Die Zellen wurden in einem 200 l Fermenter (Giovanola, Schweiz) in M9-Minimalmedium gezüchtet (in einem Liter doppelt destilliertem Wasser wurden gelöst: 6 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 0,5 g NaCl, 1 g NH_4Cl und mit folgenden sterilen Lösungen versetzt: 10 ml 40% Glucose, 1 ml 1 M $MgSO_4$, 1 ml 0,1 M $CaCl_2$). Hierzu wurden zunächst Agarplattenkulturen hergestellt und anschließend eine einzelne Kolonie in 20 ml M9-Medium überführt und bei 37°C gezüchtet (Vorvorkultur). Nach Erreichen einer OD_{578} von 1,2 - 1,5 wurden 2 l Medium mit der Vorvorkultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 1,2 - 1,5 inkubiert und die 200 l mit dieser Bakteriensuspension versetzt. Die Zellen wurden nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (dies entspricht einer OD_{578} von 0,9 - 1,2) mit einem Westphalia Separator geerntet. Bis zur Aufarbeitung wurde das Bakteriensediment bei -20°C gelagert.

2.1.2. Bakterienaufschluß

150 g tiefgefrorene Bakterien wurden unter Rühren und Erwärmen rasch aufgetaut, wobei die Temperatur der Suspension 10°C nicht überschreiten durfte. Die weiteren Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde mit 1:10 verdünntem PBS (pro 200 ml Puffer wurden in dest. Wasser 1,03 g $NaH_2PO_3 \cdot H_2O$ und 9,0 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ gelöst und auf pH 7,2 - 7,4 einge-

stellt; anschließend wurden 35 g in 200 ml dest. Wasser gelöstes NaCl zugegeben und die beiden vereinigten Lösungen 1:10 mit aqua dest. verdünnt) auf 300 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, und 12 mg Desoxyribonuclease (Boehringer, Mannheim) zugefügt. Anschließend wurden die Bakterien mit jeweils 240 g Glasperlen (Ø 0,17 - 0,18 mm) in vier gleichen Portionen unter Eiskühlung in einem Vibrogen-Homogenisator bei 5000 - 6000 Schwingungen pro Minute aufgeschlossen. Der Aufschluß der Bakterien wurde unterbrochen, wenn im Phasenkontrastmikroskop ca. 90% aller Zellen fragmentiert erschienen (Dauer 4 - 7 Minuten). Das Zellhomogenisat wurde über eine G 2 Glasfilternutsche von den Glasperlen abgetrennt. Das Filtrat und Waschwasser (1:10 verdünntes PBS) wurde mit 11 Volumenprozenten 0,1 M EDTA pH 8,0 versetzt und abzentrifugiert (1,5 h bei 4°C, 20 000·g). Das Sediment, das die abgetrennten Zellen enthielt, wurde unter Zuhilfenahme eines Ultraschallgeräts (Labsonic 1510, Braun, 400 Watt) in 600 ml 1:10 verdünntem PBS resuspendiert und zentrifugiert (1 h bei 4°C, 20 000·g). Anschließend wurden die aufgebrochenen Bakterien noch zweimal in verdünntem PBS gewaschen (1 h bei 4°C, 20 000·g).

2.1.3. Abtrennung des Mureins

Die homogene Suspension (vergl. 2.1.2) wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe allmählich in 2,4 l siedende 4prozentige SDS-Lösung eingeleitet (ca. 20 Tropfen/Minute). Nachdem die klare Lösung abgekühlt war, wurde der Murein-Lipoprotein-Komplex vom freien Lipoprotein durch einen 1,5stündigen Zentrifugationsschritt bei 20 000·g abgetrennt und jeweils 500 ml des Überstands mit 250 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 200 ml 20 mM EDTA pH 8,0 und 150 ml n-Butanol versetzt. Die Lösung wurde im Eisbad auf 4°C abgekühlt und anschließend zu jeweils 500 ml der Lösung 25 ml 4 N Natriumacetatpuffer pH 5,5 zugegeben und schließlich der pH-Wert auf 5,2 eingestellt. Nach

20minütiger Inkubation im Eis wurde der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und verworfen (10 min, 13 000·g, 4°C). Der Lösung wurden 2 Volumenprozent 1 M $MgSO_4$ und 5,5 Volumenprozent Aceton in der Kälte zugesetzt. Im Anschluß an eine 20minütige Inkubation bei 4°C wurde abzentrifugiert (10 min, 13 000·g, 4°C), das Sediment verworfen und der Überstand tropfenweise unter Rühren mit 30 Volumenprozent Aceton versetzt. Die Lösung wurde für mindestens weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert, der entstandene weiße Niederschlag abzentrifugiert (10 min, 13 000·g, 4°C) und das Sediment in 100 ml S-Puffer (10 mM Na_3PO_4, 10 mM EDTA) mit Hilfe eines Ultraschallstabes dispergiert.

2.1.4. Phenolextraktion

Zu der erhaltenen Lösung wurde das gleiche Volumen 90%igen wässrigen Phenols zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur kräftig gerührt um freies Lipoprotein vom Lipopolysaccharid zu trennen. Die Phasentrennung erfolgte durch einen 10minütigen Zentrifugationsschritt (13 000·g bei Raumtemperatur). Die obere, wässrige Phase, die noch Reste von Lipoprotein enthält, wurde erneut mit 100 ml Phenollösung extrahiert. Die vereinigten Phenolphasen wurden im Anschluß daran noch zweimal mit 100 ml bzw. 50 ml dest. Wasser gewaschen und jeweils für 10 Minuten wie oben beschrieben zentrifugiert. Die vereinigten und gewaschenen Phenolphasen wurden mit dem doppelten Volumen Aceton und Diäthyläther versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde der größte Teil des klaren Überstandes entfernt und die Restsuspension abzentrifugiert (10 min, 12 000·g, 4°C). Mit Hilfe eines Ultraschallstabs wurde das Pellet in 50 ml 1%igem SDS (in 1:10 verdünntem PBS) aufgenommen und mit 0,5 ml 1 M $MgSO_4$ versetzt.

2.1.5. Fraktionierte Acetonfällung

Im Anschluß an den unter 2.1.4 beschriebenen Arbeitsschritt wurde die Lipoprotein-Lösung unter Rühren tropfenweise mit 5 ml Aceton versetzt und weitere 20 Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (10 min, 12 000·g, 4°C). Zur Ausfällung von freiem Lipoprotein wurde der Überstand erneut mit 5 - 7 ml Aceton gefällt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 12 000·g, 20°C) wurde das sedimentierte Lipoprotein in 20 ml 1%iger SDS-Lösung aufgenommen, mit 2 ml Aceton versetzt und erneut gefällt und zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde durch 2 ml Aceton freies Lipoprotein ausgefällt. Das im letzten Zentrifugationsschritt erhaltene Protein wurde noch zweimal mit Aceton gewaschen (10 min, 12 000·g, 20°C) und schließlich in 10 ml dest. Wasser aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert. Um sicherzugehen, daß das Lipoprotein quantitativ gefällt wurde, wurde aus dem Überstand der letzten Fällung mit 3 ml Aceton restliches Lipoprotein entfernt und wie oben beschrieben verfahren.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Proteinbestimmung

Für die Ermittlung des Proteingehalts der FLP-Präparationen wurde der Bio-Rad-Protein-Test (Bio-Rad, München) verwendet (50). Er beruht auf der von Bradford beschriebenen Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration (51).

20 - 100 µl der zu bestimmenden Lösung wurden mit dest. Wasser auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und

200 µl Reagenzlösung dazugegeben. Dann wurde kräftig gemischt und die entstandene Blaufärbung der Proben nach 5 min als Extinktion bei 595 nm am Photometer (Carl Zeiss, Oberkochen) gemessen.

Für die Erstellung einer Eichkurve wurde eine BSA-Lösung (1 mg/ml, Sigma, München) verwendet. Es wurden 1 - 100 µl dieser Vergleichslösung zur Bestimmung eingesetzt und wie oben beschrieben verfahren.

2.2.2. Analytische Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Charakterisierung der FLP-Präparationen wurden Polyacrylamidgelelektrophoresen durchgeführt. Folgende Puffer wurden verwendet:

Stammlösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese:

Trenngelpuffer:
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- 0,4 % SDS

Sammelgelpuffer:
- 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
- 0,4 % SDS

Elektrodenpuffer:
- 0,075 M Tris-HCl pH 8,3
- 0,1 % SDS
- 0,192 M Glycin

Acrylamidstammlösung:
- 29,2 g Acrylamid (Serva, Heidelberg)
- 0,8 g Bisacrylamid (Serva, Heidelberg)
- mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen
- und filtrieren

Es wurden lineare Gradientengele mit Acrylamidkonzentrationen im Bereich von 10 - 20% verwendet.

Pipettierschema für ein Gradientengel:

Gelkonzentrationen:	10 %	20 %
Trenngelpuffer:	5,50 ml	2,50 ml
Acrylamidstammlösung:	7,26 ml	6,70 ml
Dest. H_2O:	9,24 ml	---
TEMED:	12,00 µl	6,00 µl
10 % APS:	44,00 µl	22,00 µl

Für ein Vertikalgel der Größe 95 x 130 x 0,75 mm^3 wurden 7 ml der höher konzentrierten und 6 ml der geringer konzentrierten Acrylamidlösung benötigt. Vor Gebrauch wurden sie an einer Wasserstrahlpumpe evakuiert.

Das Trenngel wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe und eines Gradientenmischers gegossen. Um eine saubere Polymerisationsgrenze zu erhalten, wurde sofort mit ca. 1 ml dest. H_2O überschichtet. Nach 4stündiger Polymerisation wurde das Wasser mit einem Filterpapierstreifen entfernt und ein Sammelgel mit folgender Zusammensetzung aufgetragen:

1,25 ml Sammelgelpuffer
0,75 ml Acrylamidstammlösung
3,00 ml dest. H_2O
5,00 µl TEMED
15,00 µl 10 % APS

Über Nacht wurde das Gel bei 4°C aufbewahrt um eine vollständig homogene Polymerisation zu gewährleisten.

Die Proteinproben (10 µl) wurden mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 10% 2-Mercaptoethanol,

0,005% Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)) und für 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert. Es wurden jeweils 18 µl Proteinlösung pro Probentasche aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte in Richtung Anode bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA. Unter diesen Bedingungen betrug die Elektrophoresedauer 3,5 - 4 Stunden.

2.2.3. Färbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blue (52, 53)

Die Gelmatrix wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine für mindestens zwei Stunden in einer Lösung folgender Zusammensetzung gefärbt:

454 ml	Methanol/H_2O (1:1)
46 ml	Eisessig
1,25 g	Coomassie Brilliant Blue R250 (Chroma Gesellschaft, Stuttgart).

Die Färbelösung muss filtriert werden.

Um distinkte Proteinbanden erkennen zu können, wurde das Gel anschließend unter wiederholtem Wechseln der Entfärbelösung (75 ml Eisessig, 50 ml Methanol, 1875 ml destilliertes Wasser) entfärbt.

2.3. Methoden zur Untersuchung der biologischen Wirkung von Mitogenen auf Leukozyten in vitro

2.3.1. Isolierung verschiedener Zellpopulationen

Für die in der Arbeit aufgeführten Experimente wurden Tiere verschiedener Mäuseinzuchtstämme im Alter von 6 - 10 Wochen verwendet.

Die Tiere wurden durch Dislokation des Visceralwirbels getötet und die entsprechenden Organe steril entnommen. Alle Arbeiten zur Zellaufbereitung wurden bei 4°C vorgenommen. Sämtliche Arbeitsgeräte wurden vor Gebrauch sterilisiert.

2.3.1.1. Präparation von Milzlymphozyten

Die Milzen der Inzuchtmäuse wurden in einem Glashomogenisator in 10 ml MEM (Flow Laboratories, Meckenheim) zur Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Um Gewebereste von den Zellen zu trennen, wurde das Homogenisat über ein Wattefilter gegeben und die Zellen noch zweimal mit jeweils 20 ml MEM gewaschen (10 min, 400·g, 4°C). Die Lymphozyten wurden in RPMI-Kulturmedium, dem 3,3% (v/v) hitzeinaktiviertes (30 min bei 56°C) foetales Kälberserum (Seromed, München) zugesetzt wurde, aufgenommen, und auf einen Zelltiter von $3{,}3 \cdot 10^6$ /ml eingestellt.

Zusammensetzung des RPMI- Mediums:

RPMI-1640 ßPSG-Konzentrat (Lösung 1):

100 ml RPMI 1640 mit 25 mM Hepes und 25 mM Glutamin (Flow Laboratories, Meckenheim)
20 ml L-Glutamin (200 mM), (Flow)
10 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (je 10000 U/ml), (Gibco)
400 µl ß-Mercaptoäthanolstammlösung (Lösung 2)

Mercaptoäthanolstammlösung (Lösung 2):

100 µl ß-Mercaptoäthanol
9,9 ml RPMI 1640

Zu jeweils 100 ml RPMI 1640 wurden 11 ml der Lösung 2 zugesetzt und als Zellkultivierungsmedium in den in vitro-Tests verwendet.

2.3.1.2. Präparation von Thymozyten

Einer durch Genickbruch getöteten Maus wurde der Thymus steril entnommen und wie in Abschnitt 2.3.1.1 für Milzzellen beschrieben, aufgearbeitet. Der Zelltiter wurde in diesem Fall auf $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt.

2.3.1.3. Präparation von Lymphknotenzellen

Getöteten Tieren wurden die Lymphknoten des mesenterialen Gewebes entfernt und nach 2.3.1.1 weiterverarbeitet. Die Lymphknotenzellsuspension wurde auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt.

2.3.1.4. Isolierung von Lymphozyten des peripheren Bluts

Inzuchtmäusen wurde Blut aus dem retroorbitalen Venusplexus mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen und mit 4 ml MEM, dem 80 µl Natriumheparinat (5000 U/ml, Medac, Hamburg) zugesetzt worden war, gemischt. Ein 4 ml Lympholytegradient (Cedarline Laboratories, Hornby, Ontario, Canada), dem 3,3% hitzeinaktiviertes foetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurde, wurde damit vorsichtig überschichtet und 30 Minuten bei 1000·g zentrifugiert. Die Zellen, die sich gut sichtbar in einer Bande formierten, wurden mit einer Pasteurpipette entnommen und noch zweimal in 10 ml MEM gewaschen (10 min, 400·g, 4°C). Sie wurden in RPMI-Medium mit 3,3% FCS resuspendiert und auf einen Zelltiter von $2\text{-}3 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

2.3.1.5. Vitalitätsfärbung zur Bestimmung der Zellzahlen

Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurden die Zellsuspensionen im Verhältnis 1:2 mit 0,6% Essigsäurelösung

zur Lyse der Erythrozyten versetzt und dann mit dem gleichen Volumen einer Trypanblaulösung (0,4 ml Trypanblaulösung, Gibco, Wiesbaden, 0,1 ml 4,25% NaCl) gemischt. Die ungefärbten lebenden Zellen wurden anschließend in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Tote Zellen erscheinen im Phasenkontrast blau.

2.3.2. Stimulationsexperimente in vitro

Im folgenden sollte untersucht werden, inwieweit verschiedene Mitogene einen Einfluß auf die isolierten Zellpopulationen der Inzuchtmäuse ausüben.

2.3.2.1. Vorbereitung der Mitogene

Stammlösungen der im in vitro-Stimulationstest eingesetzten Mitogene wurden durch Beschallung (5 x 10 Sekunden, 400 Watt) in MEM-3,3% FCS hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen lagen bei 1 mg/ml. Die Mitogene wurden in einer Verdünnungsreihe im Stimulationstest eingesetzt. Unmittelbar vor der Verwendung der Mitogenverdünnungsstufen wurde nochmals kurz beschallt. Für Concanavalin A (Pharmacia, Freiburg) wurde eine Mitogenstammlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml hergestellt.

2.3.2.2. Stimulationstests mit Lymphozyten aus der Milz, dem Thymus und den Lymphknoten

Jeweils 133 µl der Zellsuspensionen wurden mit 50 µl der Mitogenverdünnungsstufe für 24 h in Mikrotiterplatten (Falcon, flat bottom) inkubiert (37°C, bei 6% CO_2). Jede Kultur wurde dann mit 0,625 µCi ^{3}H-Thymidin (entspricht 25 µl Lösung) versetzt und für weitere 24 h im CO_2-begasten Brutschrank inkubiert. Die ^{3}H-Thymidinlö-

sung wurde wie folgt hergestellt: zu 38,5 ml MEM wurden 0,5 ml einer Thymidinlösung (Serva, 1,2 mg/ml in MEM) und 1 ml einer ^{3}H-Thymidinlösung (Amersham Buchler, ca. 25 Ci/mmol) pipettiert. Nach Beendigung der Inkubation und anschließender Bestimmung der Zellzahl wurden die Kulturen bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen mit einem Mash II-Zellerntegerät auf Glasfilterstreifen (934 AH, Whatman) gesammelt. Die getrockneten Filter wurden in Szintillationsgläschen überführt, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiscint, Roth) versetzt und die Menge an eingebauter Radioaktivität in einem Beta-Szintillationszähler bestimmt.

2.3.2.3. Stimulationstests mit Lymphozyten des peripheren Bluts

Jeweils 50 µl der Lymphozytensuspension, deren Gewinnung unter 2.3.1.4 beschrieben wurde, wurden mit je 20 µl einer 1:2 Mitogenverdünnung in einer Mikrotiterplatte mit Rundboden (Falcon) für 24 h im CO_2-begasten Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der 24stündigen Vorinkubation wurde wie im Abschnitt 2.3.2.2 angeführt mit je 25 µl ^{3}H-Thymidinlösung markiert und analog weiterverarbeitet.

2.4. Methoden zur Untersuchung der biologischen Wirkung von Mitogenen auf Leukozyten in vivo

2.4.1. In vivo-Immunisierung von Mäusen

Jeweils 35 µg Mitogen wurde den Tieren intravenös bzw. intraperitoneal in einem Volumen von 200 µl appliziert. Die Konzentrationen der Mitogenlösungen wurden hierzu auf 175 µg/ml in MEM eingestellt und die Mitogene durch mehrmaliges Beschallen in eine homogene Suspension gebracht. Da kein Unterschied zwischen Tieren, die eine Injektion von MEM erhalten hatten und solchen, die ganz unbehandelt blieben, auftrat, wurden Kontrollgruppen nicht behandelt.

2.4.2. Präparation von Milzlymphozyten in vivo immunisierter Tiere

Durch Genickbruch getöteten Tieren wurden die Milzen entnommen, gewogen und in 5 ml MEM-0,45% Glucose im Glashomogenisator zur Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Die Zellen wurden zweimal in 5 ml MEM-0,45% Glucose gewaschen (10 min, 400·g, 4°C) und auf einen Titer von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in MEM-Glucosemedium eingestellt.

2.4.3. Syntheseraten in vivo immunisierter Milzzellen

Um eine Änderung der Proliferationsrate der in vivo vorstimulierten Milzzellen nachweisen zu können, wurden die Zellen (vergleiche Abschnitt 2.4.2) in RPMI-Medium-3,3% FCS so verdünnt, daß eine Konzentration von $3{,}3 \cdot 10^7$ Zellen/ml entstand. Zu 133 µl Kulturen wurden in Mikrotiterplatten (Falcon, flat bottom) 25 µl ^{3}H-Thymidinlösung zugegeben (vergleiche Kapitel 2.3.2.2) und für 24 h im begasten Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der

Testdauer wurden die Kulturen bei -20°C eingefroren und wie unter 2.3.2.2 beschrieben verarbeitet.

Zur Bestimmung der Proteinsyntheserate wurden die Zellen mit 25 µl ^{3}H-Leucinlösung (zu 38,5 ml MEM wurden 1 ml ^{3}H-Leucin (Amersham Buchler, ca. 50 Ci/mmol) und 0,5 ml einer Leucinlösung (Serva, 1,2 mg/ml MEM) pipettiert) und zur Ermittlung der RNA-Syntheserate mit ^{3}H-Uridin (Zusammensetzung der ^{3}H-Uridinlösung: 38,5 ml MEM, 1 ml ^{3}H-Uridin (Amersham Buchler, ca. 25 Ci/mmol) und 0,5 ml Uridinlösung (Serva, 1,2 mg/ml in MEM) inkubiert und analog behandelt.

2.4.4. Untersuchung der Antikörperproduktion von B-Lymphozyten nach in vivo-Stimulation

Die in vivo geprimten B-Lymphozyten wurden in einem hämolytischen Plaquetest auf ihre Fähigkeit zur polyklonalen Antikörpersynthese hin untersucht. Dieser Test ermöglicht es, jede einzelne immunglobulinsekretierende Plasmazelle zu erfassen.

2.4.4.1. Absorption von Komplement

Um zu verhindern, daß unspezifische, im Komplementlyophilisat vorhandene Antikörper das Testergebnis verfälschen, wurde 1 ml Komplementlösung (Paesel, nach Produktinformation gelöst) an 1 ml gepackte Schafserythrozyten (Behringwerke, Marburg) 1 Stunde bei 4°C absorbiert. Die Erythrozyten wurden hierfür zunächst in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (5 min, 1000·g) bis keine Hämolyse mehr auftrat und der Überstand klar war. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Erythrozyten durch einen Zentrifugationsschritt (5 min, 1000·g) von dem im Überstand verbliebenen Komplement abgetrennt. Für den Einsatz in den Plaquetests wurde ei-

ne geeignete Verdünnung des Komplements (1:2,5 in MEM-0,45% Glucose) hergestellt und bei -70°C aufbewahrt.

2.4.4.2. Hämolytischer Plaquetest mit TNP-beschichteten Erythrozyten (54)

1 ml gepackte Schafserythrozyten, die zuvor dreimal in 0,9%iger Kochsalzlösung (5 min, 1000·g) gewaschen worden waren, wurden in 7 ml Cacodylatpuffer (4,58 g Cacodylsäure, Natriumsalz, Sigma, München, in 100 ml dest. Wasser gelöst und auf pH 6,9 eingestellt) aufgenommen und 10 Minuten unter mehrmaligem Mischen im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blutzellen wurden im Anschluß daran solange mit Saline gewaschen, bis keine Hämolyse mehr sichtbar war. Die beschichteten Erythrozyten können in MEM-0,45% Glucose bis zu drei Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Unmittelbar vor dem Gebrauch müssen sie erneut dreimal gewaschen werden. Im Test wurde eine 30%ige (v/v) Erythrozytenlösung eingesetzt.

Für den TNP-Plaquetest wurden pipettiert:

100 µl Zellsuspension $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml
in MEM-0,45% Glucose
20 µl absorbiertes Komplement
1:2,5 in MEM-0,45% Glucose
20 µl TNP-beschichtete Erythrozyten
30%ige Suspension in MEM-0,45% Glucose
300 µl 0,5%ige Agaroselösung
in MEM-0,45% Glucose

Zunächst wurden Zellen, Komplement und Erythrozyten zusammenpipettiert. Erst unmittelbar vor dem Ausplattieren wurde die 56°C warme Agarose (Indubiose Agarose, Paesel, Frankfurt; 5% Agarose in 0,9%iger Kochsalzlösung wurde 1:10 in vorgewärmtes MEM-Glucosemedium verdünnt und während des Tests im Wasserbad bei 56°C inkubiert)

dazupipettiert, gut gemischt und rasch in eine Petrischale (Ø 9 cm) ausplattiert. Um ein homogenes Erstarren der Agarose zu gewährleisten, wurden die Petrischalen zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Zur Ausbildung der Plaques wurden die Kulturen anschließend 3 h im wasserdampfgesättigten Brutschrank inkubiert.

2.4.4.3. Hämolytischer Plaquetest mit unbeschichteten Erythrozyten

Parallel zu den Ansätzen mit TNP-SRBC wurden Plaquetests mit unbehandelten Erythrozyten durchgeführt. Der Test verlief wie unter 2.4.4.2 angegeben.

2.4.4.4. Hämolytischer Plaquetest mit Protein A-beschichteten Erythrozyten (55)

Zu 200 µl gepackten Erythrozyten (dreimal in Saline gewaschen, 5 min, 1000·g) wurden 100 µl Protein A-Lösung (1 mg/ml in Saline, Pharmacia Fine Chemicals), 100 µl Saline und 2 ml einer 1:200 in Saline verdünnten $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M $CrCl_3$-Lösung pH 4,5 pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Chromchloridlösung muß mindestens vier Wochen alt sein, um eine optimale Beschichtung der Erythrozyten mit Protein A zu gewährleisten (56).

Im Abstand von 15 Minuten wurde die Mischung geschüttelt, damit sich die Zellen nicht absetzen. Die SRBC wurden mehrmals mit Saline gewaschen und schließlich in MEM-0,45% Glucose aufgenommen, so daß eine 30%ige Suspension erhalten wurde. Die Erythrozyten sind 3 Tage im Kühlschrank stabil.

Als Entwicklungsserum für den Protein A-Plaquetest wurde ein von Dr. R. B. Johnson, Tübingen, hergestelltes Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulinserum in geeigneter

Verdünnung eingesetzt. Die für den TNP-Plaquetest auf $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellte Lymphozytensuspension wurde für den Protein A-Test 1:20 in MEM-0,45% Glucose verdünnt.

Für den Protein A-Test wurden pipettiert:

100 µl Zellsuspension $5,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in MEM-0,45% Glucose
20 µl Protein A-beschichtete Schafserythrozyten 30%ig in MEM-0,45% Glucose
20 µl Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Lösung 1:20 in MEM-0,45% Glucose
20 µl absorbiertes, verdünntes Komplement
300 µl 0,5% Agarose in MEM-0,45% Glucose

Nach der Zugabe von warmer Agaroselösung wurde verfahren wie in Abschnitt 2.4.4.2 beschrieben. Allerdings konnte die Auszählung der Protein A-Plaques erst nach 4 - 6stündiger Inkubation bei 37°C erfolgen.

2.5. Methoden zur Untersuchung der Makrophagen- und Monozytenaktivierung

2.5.1. Makrophagenaktivierung in vitro

Um zu untersuchen, ob durch unsere Mitogene eine Stimulation von Gewebsmakrophagen induziert werden kann, wurden Peritonealmakrophagen in vitro mit den Substanzen inkubiert und ein enzymatischer Test als Maß für ihre Aktivierung eingesetzt.

2.5.1.1. Immunisierung mit Thioglycollat

Mäusen im Alter von 8 Wochen wurden drei Tage vor Beginn des in vitro-Tests 2 ml einer 3%igen, autoklavierten Lösung von Thioglycollat (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) in doppelt destilliertem Wasser intraperitoneal injiziert. Die Thioglycollatlösung wird im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Ihre Effektivität wird durch Altern über 2 - 4 Monate erhöht.

2.5.1.2. Präparation von Peritonealmakrophagen

Tieren, denen Peritonealmakrophagen entnommen werden sollten, wurde bei der Präparation das Peritoneum zunächst nicht geöffnet. Vielmehr wurde das Fell vorsichtig über der Leibeshöhle aufgeschnitten und sorgsam entfernt. In die Bauchhöhle wurden dann 5 ml MEM-Heparinat (5 units/ml) gespritzt und leicht massiert. Mittels einer Pasteurpipette wurde die die Zellen enthaltende Flüssigkeit aus dem Peritoneum zurückgewonnen. Nachdem die Zellen zweimal in MEM-10% FCS gewaschen worden waren, wurden sie in RPMI/MEM-Medium (RPMI-Medium und MEM im Verhältnis 4:1, mit 10% FCS) auf einen Titer von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

2.5.1.3. 5'-Nucleotidasetest (57, 58)

Gewebsmakrophagen naiver bzw. thioglycollatimmunisierter Tiere wurden isoliert wie in Abschnitt 2.5.1.2 beschrieben. In Petrischalen mit 3 cm Durchmesser wurden 2,5 ml der Makrophagensuspension pipettiert, was einer absoluten Zahl von 10^6 Zellen pro Ansatz entspricht. Zu den Peritonealmakrophagen wurden 300 µl Mitogenlösung (MEM-10% FCS, Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml) und 200 µl MEM-10% FCS zugesetzt. Die Mitogenkonzentration betrug damit 100 µg/ml. Nach 24stündiger

Inkubation bei 37°C, 6% CO_2 wurde der Überstand aus den Petrischalen abpipettiert und die adhärenten Zellen zweimal mit MEM bei 25°C gewaschen um Proteine des foetalen Kälberserums zu entfernen. Durch 1 ml Triton-Puffer (54 mM Tris-HCl pH 9,0, 12 mM $MgCl_2$, 0,05% Triton X-100) wurden die Zellen lysiert (20 min im Eisbad).

300 µl des Zellysats wurden mit 200 µl THM-Puffer (entspricht Triton-Puffer, aber ohne Triton X-100) und 200 µl ^{3}H-AMP-Lösung (0,64 mg AMP, 1 µl Adenosin--[2-^{3}H]-5'Monophosphat, Ammoniumsalz (Amersham Buchler), 19 Ci/mmol in 10 ml THM-Puffer) versetzt und für 1 h bzw. 2 h bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von je 150 µl 0,25 M $ZnSO_4$- und 0,25 M $Ba(OH)_2$-Lösung beendet. Nicht hydrolysiertes Adenosinmonophosphat und Bariumsulfat copräzipitieren unter diesen Bedingungen. Der entstandene Niederschlag wurde durch einen 10minütigen Zentrifugationsschritt bei 10 000·g entfernt und die Menge an entstandenem Adenosin bestimmt, indem 400 µl des Überstands mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt wurden und die darin verbliebene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen wurde.

Die Menge an gebildetem Adenosin nach einer Inkubation von einer bzw. zwei Stunden wurde aufgetragen und aus der Steigung der so erhaltenen Geraden die Reaktionsrate bestimmt. Spezifische Enzymaktivitäten wurden als nmol AMP/(min·mg Protein) angegeben. Die Proteinbestimmung erfolgte durch die im Abschnitt 2.2.1 beschriebene Bio-Rad Protein-Mikromethode.

2.5.2. Monozytenaktivierung in vivo

Inzuchtmäusen wurden drei Tage vor dem Test 35 µg Mitogen in 200 µl MEM (vergleiche Abschnitt 2.4.1) intravenös verabreicht.

2.5.2.1. Beseitigung von Kohlenstoff aus dem Blut immunisierter Tiere

Drei Tage nach in vivo-Immunisierung der Tiere wurden 200 µl einer feinen Kohlenstoffsuspension (1,24 ml Tusche (Pelikan, Hannover, entspricht 0,2 mg Kohlenstoff), 8 ml Saline, 1 ml 10% Gelatine in Saline gelöst) in die Schwanzvene gespritzt. Die Lösung wurde bei 60°C im Wasserbad warmgehalten. Unmittelbar nach der Injektion, und dann zu den Zeitpunkten 0,5, 1, 3, 5, 7, 10, 15 und 20 Minuten danach, wurde Blut aus dem retroorbitalen Venusplexus entnommen. Die Blutentnahme erfolgte mittels heparinisierter Hämatokritröhrchen (Hettich, Tuttlingen). Zur Graduierung der Röhrchen wurde zuvor 40 µl doppelt destilliertes Wasser in die Röhrchen pipettiert und die Lage des Meniskus markiert. Jeweils 40 µl entnommenes Blut wurden in 3 ml 0,1%ige wässrige Natriumcarbonatlösung gegeben. Dabei lysieren die Erythrozyten. Die Bestimmung der Kohlenstoffabnahme im Blut erfolgt photometrisch über die Extinktion bei 675 nm gegen das Blut (40 µl in 3 ml Natriumcarbonatlösung) eines Tieres, das weder immunisiert noch mit Kohlenstofflösung behandelt war. Die Extinktionswerte sollten unter diesen Bedingungen zwischen 0,45 und 0 liegen. Der Phagozytoseindex (K) (siehe Kapitel 3.3.5.2) ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden, die man durch Auftragen der gemessenen Extinktionswerte über der Entnahmezeit erhält. Pro Versuchsgruppe wurden die Phagozytoseindices von mindestens fünf individuellen Tieren bestimmt.

2.6. Methoden zur Trennung von B- und T-Lymphozyten

B- und T-Lymphozyten aus der Milz immunisierter bzw. unbehandelter Tiere wurden mit Hilfe von anti-Theta- bzw. anti-Immunglobulinserum und Komplement aufgetrennt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

2.6.1. Trennung von B- und T-Lymphozyten mit anti-Theta- und anti-Immunglobulinseren und mit Komplement

Die Milzen von Balb/c-Mäusen wurden zur Einzelzellsuspension aufgearbeitet (vergleiche Abschnitt 2.3.1.1) und abzentrifugiert (10 min, 400·g). $1 \cdot 10^7$ Milzzellen wurden in 1 ml anti-Theta-Serum (von H. Wagner, Mainz, zur Verfügung gestellt, 1:20 verdünnt) resuspensiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal in 5 ml MEM gewaschen, in 1 ml 1:6 verdünntem Meerschweinchenkomplement aufgenommen, 40 min bei 37°C inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Die verbliebenen Zellen wurden in RPMI-Kulturmedium-3,3% FCS resuspendiert und auf einen Titer von $3,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die so gewonnenen Populationen wurden im Stimulationstest (vergleiche Abschnitt 2.3.2.2) untersucht.

Für die zytotoxische Eliminierung von B-Lymphozyten wurde ein Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulinserum in einer Verdünnung von 1:20 verwendet. Im übrigen wurde wie für das anti-Theta-Serum beschrieben verfahren.

2.6.2. FITC-Markierung von Antiseren (59, 60, 61)

Die zu markierende Antiserum-Probe (10 - 20 mg/ml) wurde für mindestens 2 Stunden bei 4°C gegen 0,05 M bicarbonatgepufferte Saline pH 9,2 dialysiert. Um FITC (Schuchart, München) an die Antikörper zu koppeln erfolgte erneut eine Dialyse und zwar 14 - 16 Stunden gegen das 10fache Volumen einer Lösung von 100 µg FITC/ml in 0,05 M bicarbonatgepufferter Saline.

Die FITC-Lösung mußte vor Gebrauch 3 mal 15 Sekunden mit 100 Watt beschallt werden.

Zum Beenden der Kopplungsreaktion wurde 2 - 3 Stunden gegen 0,02 M phosphatgepufferte Saline pH 7,0 dialysiert. Das FITC-Antikörperkonjugat wurde bei -20°C in Aliquots von je 20 µl aufbewahrt.

2.6.3. Fluoreszenzmarkierung von Zellen

Ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden für 10 min bei 400·g abzentrifugiert und zweimal in MEM gewaschen. Das Sediment wurde mit 20 µl FITC-markiertem Antiserum versetzt und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde dreimal mit je 500 µl MEM gewaschen und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung von freiem Lipoprotein

3.1.1. Anzucht der Bakterien

Ein 200 l Fermenter wurde mit 2 l einer Vorkultur angeimpft und bei einer OD_{578} von 0,9 - 1,2 geerntet (vergl. Kapitel 2.1). Die Ausbeute betrug 450 g feuchte Bakterienmasse.

3.1.2. Isolierung von freiem Lipoprotein

Freies Lipoprotein wurde nach der von Inouye beschriebenen Methode (49) aus dem Bakterienstamm Escherichia coli B/r isoliert (vergl. Material und Methoden 2.1.). Die Ausbeute an Lipoprotein lag im Bereich von 24 bis 32 mg pro 150 g eingesetzten Bakterien.

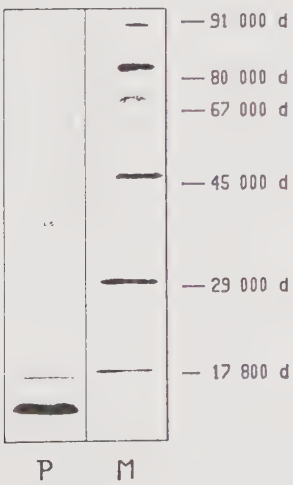


Abbildung 1: Elektropherogramm zur Präparation von Lipoprotein.
Zur Charakterisierung der Proteinpräparationen wurde ein lineares SDS-Polyacrylamidgradientengel von 10 - 20% verwendet. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Blue.
Die Bahnen zeigen:
M : Markerproteine :
Phosphorylase A (91 000 d),
Human-Transferrin (80 000 d),
BSA (67 000 d),
Albumin (45 000 d),
Carboanhydrase (29 000 d),
Myoglobin (17 800 d).
P : Pellet der FLP-Fällung

3.1.3. Gelelektrophoretische Untersuchung von FLP

Lipoprotein, das nach der im Abschnitt 2.1 beschriebenen Methode isoliert worden war, wurde einer analytischen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen und somit charakterisiert (Abbildung 1).

3.2. Mitogene Aktivität von Lipoprotein und seinen synthetischen Analoga in vitro

Bakterielle Oberflächenkomponenten wie Lipopolysaccharid (36), Lipoprotein (34), Protein I und Protein II* (33) zeigen mitogene Aktivität auf B-Lymphozyten, die sie sowohl zur Proliferation als auch zur Immunglobulinsekretion stimulieren (62). Bei Lipoprotein, das von V. Braun charakterisiert und sequenziert wurde (63), ist der N-terminale, drei Fettsäuren tragende Lipopeptidteil für die Mitogenität verantwortlich (64).

Um exaktere Aussagen über die minimale Struktur machen zu können, die für diese biologische Wirkungsweise in vitro verantwortlich ist, wurden mehrere den N-terminalen Lipidteil tragende Verbindungen synthetisiert (65). S-[2,3-bis(palmitoyl)-(2RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-cystein wird im folgenden als Tripalmitoylcystein bezeichnet, und wenn es an Cystein gebunden die Aminosäuresequenz -Ser-Ser-Asn-Ala-OH trägt, als Tripalmitoylpentapeptid.

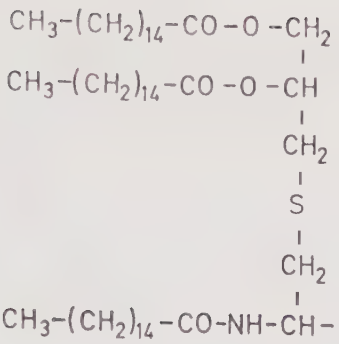


Abbildung 2: Struktur der synthetisch hergestellten Verbindungen. Für X steht im Falle des Tripalmitoylcysteins -OCH3, beim Tripalmitoylpentapeptid die Aminosäuresequenz -Ser-Ser-Asn-Ala-OH.

3.2.1. In vitro-Aktivierung von B-Lymphozyten durch Lipoprotein und seine synthetischen Analoga

Die mitogene Aktivierung der Milzzellen durch E. coli Lipoprotein, Lipopolysaccharid [1] und die synthetischen Lipoproteinanaloga zur Proliferation sollte zunächst in einem in vitro-System untersucht werden. Biologisches Testmaterial waren isolierte Milzzellen verschiedener Mäusestämme. Als Maß für die Stimulierung diente der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die neusynthetisierte DNA der sich teilenden Zellen.

3.2.1.1. In vitro-Aktivierung von Milzzellen verschiedener Mäusestämme durch Lipoprotein, Lipopolysaccharid und Concanavalin A

Erste Stimulationsversuche zur biologischen Wirkung verschiedener Mitogene in vitro wurden mit Milzlymphozy-

---

1 von Herrn Dr. W. Scheuer, Tübingen, zur Verfügung gestellt

ten des Balb/c-Inzuchtstammes durchgeführt. Abbildung 3 zeigt die mitogenen Effekte von E. coli Lipoprotein, Lipopolysaccharid und, als Vergleichsexperiment, von Concanavalin A in Abhängigkeit von der eingesetzten Mitogenmenge.

Der Einbau von ^{3}H-Thymidin in Milzzellkulturen von Balb/c-Mäusen (Ivanovas, Kisslegg, BRD) ist in Gegenwart von Lipoprotein deutlich erhöht. Die maximale Stimulation erhält man bei Konzentrationen im Bereich von 30 - 70 µg/ml, wobei eine gegenüber der Kontrolle 12fach höhere Einbaurate erzielt werden kann. Bei höheren Mitogenkonzentrationen geht der Einbau von radioaktivem Material drastisch zurück. Auch Lipopolysaccharid aus Escherichia coli induziert bei Milzzellsuspensionen von

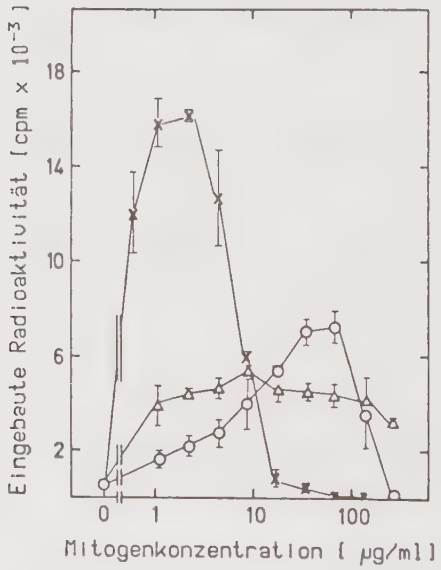


Abbildung 3: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Balb/c-Milzzellkulturen (4,4 • 10^{5} Zellen) nach 48 h Inkubation mit E. coli Lipoprotein (O), E. coli Lipopolysaccharid (△) oder Concanavalin A (×). Die Markierung erfolgte während der letzten 24 h des Tests. Jeder Punkt repräsentiert die Durchschnittswerte ± SD von drei Parallelansätzen.

Balb/c-Mäusen eine Erhöhung der Proliferationsrate. Jedoch zeigt der Kurvenverlauf in diesem Fall keine typische Optimumskurve, vielmehr bleibt die mitogene Aktivität von LPS über einen Konzentrationsbereich von 1 - 100 µg/ml annähernd konstant.

Das T-Zell-Mitogen Concanavalin A (Con A), das in allen in vitro-Experimenten als Vergleichssubstanz eingesetzt wurde, zeigt ein Stimulationsoptimum bei 2 - 4 µg/ml. Bei höheren Konzentrationen ist ein stark verminderter Einbau von ^{3}H-Thymidin zu verzeichnen.

Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, wirkt auch Lipopolysaccharid auf Lymphozyten als mitogener Reiz. Da jedoch alle Lipoproteinpräparationen noch bis zu 3% LPS enthalten, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die gleichen Experimente mit Zellen von C3H/HeJ-Mäusen (Jackson Laboratories, Bar Harbour, Maine, USA) durchgeführt. Diese Tiere können aufgrund eines genetischen Defektes nicht durch LPS mitogen stimuliert werden (66, 67).

Lipoprotein ist auch bei Lymphozyten des C3H/HeJ-Stammes in der Lage, eine Erhöhung der DNA-Synthese zu induzieren. Die Stimulationsoptima liegen auch hier, wie bei Balb/c-Lymphozyten, im Bereich von 30 - 70 µg/ml, während bei höheren Mitogenkonzentrationen der Einbau von ^{3}H-Thymidin wieder deutlich abnimmt. Bei optimaler Lipoproteinkonzentration wird eine gegenüber der Kontrolle 10fach höhere DNA-Syntheserate beobachtet (Abbildung 4).

Im Gegensatz zu Lipoprotein zeigt Lipopolysaccharid auf Lymphozyten der C3H/HeJ-Linie keine Wirkung. Aus diesen Experimenten wird deutlich, daß die durch Lipoprotein hervorgerufene mitogene Aktivität nicht auf Endotoxinkontamination zurückzuführen ist.

In einem Vergleichsexperiment mit Con A erhält man das gleiche Kurvenprofil wie bereits bei Balb/c-Lymphozyten mit einem Optimum bei 2 µg/ml (siehe Abb. 3).

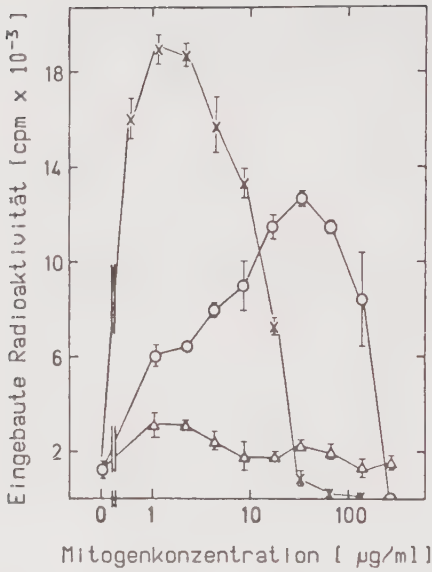


Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von C3H/HeJ-Milzzellkulturen (4,4 • 10^{5} Zellen) nach 48 h Inkubation mit E. coli Lipoprotein (O), E. coli Lipopolysaccharid (△) oder Concanavalin A (×). Die Markierung erfolgte während der letzten 24 h des Tests. Jeder Punkt repräsentiert die Durchschnittswerte ± SD von drei Parallelansätzen.

Um Aufschluß darüber zu erhalten, welche Lymphozytenpopulationen an der mitogenen Stimulation durch Lipoprotein beteiligt sind, wurden die oben beschriebenen Experimente zusätzlich mit Milzzellen nackter Mäuse durchgeführt. Durch ein angeborenes Fehlen des Thymus (68) sind diese Tiere nicht in der Lage, T-Vorläuferzellen zu funktionellen T-Lymphozyten ausreifen zu lassen (69, 70). Können dennoch mitogene oder antigene Immunreaktionen ausgelöst werden, so sind das erste Hinweise auf T-Zell-unabhängig ablaufende Prozesse. Das Ergebnis des Stimulationsexperiments ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

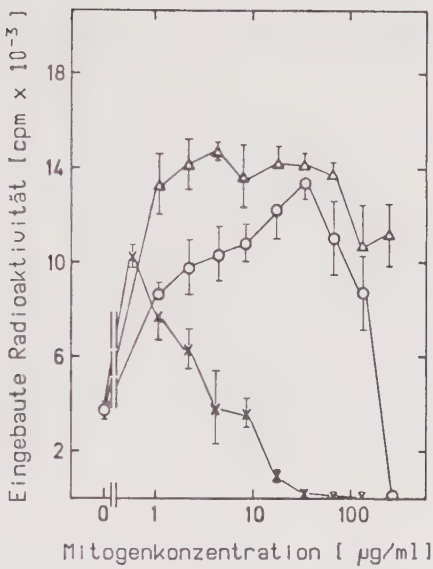


Abbildung 5: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von C3H/Tif/Bom-nu nu-Milzzellkulturen (4,4 · 10^{5} Zellen) nach 48 h Inkubation mit *E. coli* Lipoprotein (○), *E. coli* Lipopolysaccharid (△) oder Concanavalin A (×). Die Markierung erfolgte während der letzten 24 h des Tests. Jeder Punkt repräsentiert die Durchschnittswerte ± SD von drei Parallelansätzen.

Wie auch schon in der bisherigen Experimenten wird in einer Suspension von Milzzellen aus C3H/Tif/Bom-nu nu-Mäusen (Bomholtgard, Ry, Dänemark) der Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA sich teilender Zellen durch Lipoprotein und Lipopolysaccharid stark erhöht. Optimale Konzentrationen für Lipoprotein liegen hier bei 20 - 70 µg/ml, wohingegen für Lipopolysaccharid kein Maximum zu erkennen ist.

Wenn Con A als Mitogen in der Kultur anwesend ist, tritt nur bei den niedrigsten Mitogenkonzentrationen (im Bereich von 0,5 bis 2 µg/ml) eine nennenswerte Stimulation auf, während bei allen anderen Konzentrationen kein vermehrter Einbau zu verzeichnen ist.

3.2.1.2. In vitro-Aktivierung von Milzzellen verschiedener Mäusestämme durch die synthetischen Analoga

Um die von der Arbeitsgruppe um G. Jung synthetisierten Verbindungen auf ihre biologische Aktivität hin zu untersuchen, wurden in vitro Stimulationsexperimente analog den mit Lipoprotein beschriebenen, durchgeführt. Die mitogenen Effekte auf Milzzellkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration der synthetischen Verbindungen können aus Abbildung 6 entnommen werden.

Ihre Anwesenheit in Lymphozytenkulturen von Balb/c-Mäusen induziert eine Erhöhung der Proliferation, was aus dem verstärkten Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin ersichtlich wird. Die Dosis, mit der in Gegen-

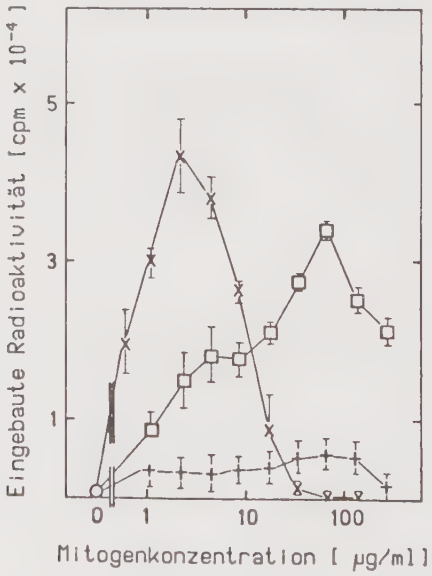


Abbildung 6: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Balb/c-Milzzellkulturen ($4{,}4 \cdot 10^{5}$ Zellen) nach 48 h Inkubation mit Tripalmitoylpentapeptid (□), Tripalmitoylcystein (+) oder Concanavalin A (×). Die Markierung erfolgte während der letzten 24 h des Tests. Jeder Punkt repräsentiert die Durchschnittswerte ± SD von drei Parallelansätzen.

wart von Tripalmitoylpentapeptid eine maximale Einbaurate erreicht werden kann, liegt bei ungefähr 70 µg/ml. Größere Mengen dieses Mitogens in Kulturen verringern die Proliferationsrate deutlich. Auch mit Tripalmitoylcystein wird eine signifikante, wenn auch im Vergleich zu Pentapeptid nur marginale Stimulation erreicht. Mit steigender Mitogenkonzentration wird zunehmend mehr radioaktives Material eingebaut, bis bei ca. 70 µg/ml Mitogen im Ansatz ein Maximum erreicht wird. Allerdings beträgt der Stimulationsindex nur etwa 15% des in Anwesenheit von Tripalmitoylpentapeptid erreichten. Con A, das zur besseren Vergleichbarkeit der Experimente untereinander eingesetzt wurde, zeigt das bereits bekannte Verhalten. Die optimale Konzentration liegt wiederum bei 2 µg/ml.

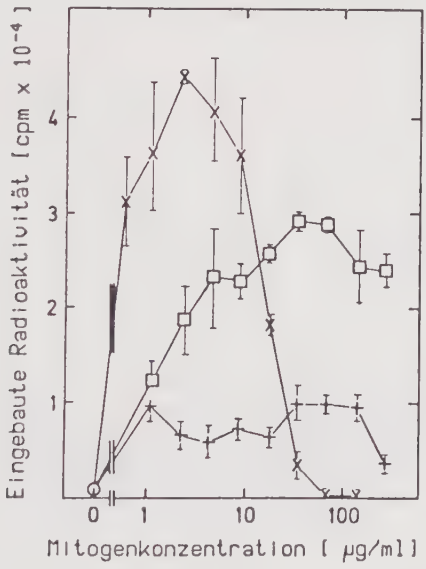


Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von C3H/HeJ-Milzzellkulturen (4,4 · 10^{5} Zellen) nach 48 h Inkubation mit Tripalmitoylpentapeptid (□), Tripalmitoylcystein (+) oder Concanavalin A (×). Die Markierung erfolgte während der letzten 24 h des Tests. Jeder Punkt repräsentiert die Durchschnittswerte ± SD von drei Parallelansätzen.

In Ergänzung zu den mit Balb/c-Lymphozyten in vitro durchgeführten Stimulationsexperimenten wurde die mitogene Aktivität der synthetischen Lipoprotein-Analoga auf C3H/HeJ-Milzlymphozyten bestimmt. Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, zeigen beide synthetischen Verbindungen auch auf Lymphozyten des C3H/HeJ-Inzuchtstammes deutlich mitogene Eigenschaften. Die in diesen Experimenten erhaltenen Daten decken sich mit denen aus Abbildung 6.

Somit sind sowohl Tripalmitoylpentapeptid als auch, wenn auch in geringerem Umfang, Tripalmitoylcystein in der Lage, Lymphozyten verschiedener Mäusespezies zu einer unspezifischen Immunantwort anzuregen.

Um Informationen darüber zu erhalten, ob auch beide synthetische Verbindungen, wie das native Lipoprotein,

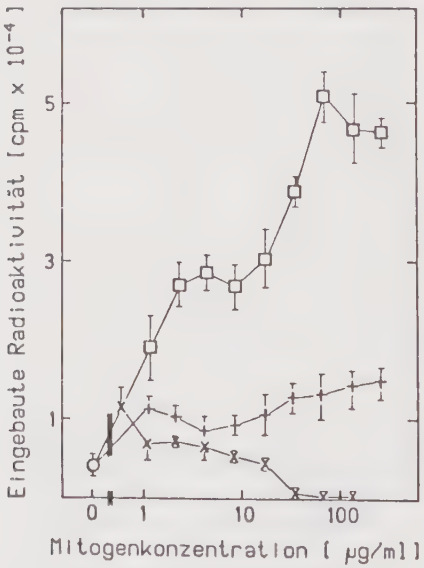


Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von C3H/Tif/Bom-nu nu-Milzzellkulturen (4,4 · 10^{5} Zellen) nach 48 h Inkubation mit Tripalmitoylpentapeptid (□), Tripalmitoylcystein (+) oder Concanavalin A (×). Die Markierung erfolgte während der letzten 24 h des Tests. Jeder Punkt repräsentiert die Durchschnittswerte ± SD von drei Parallelansätzen.

die Fähigkeit besitzen, "T-Zell-freie" Lymphozytenpopulationen der thymuslosen Mäuse zur Proliferation zu induzieren, wurden Milzzellsuspensionen von C3H/Tif/Bom-nu nu-Mäusen in Gegenwart der synthetischen Mitogene inkubiert und im Anschluß daran die Mengen des eingebauten tritiierten Thymidins bestimmt. Die Ergebnisse eines dieser Experimente sind in Abbildung 8 dargestellt.

Die weitaus bedeutendste Stimulation ist erneut mit Tripalmitoylpentapeptid zu verzeichnen, während abermals das Tripalmitoylcystein nur eine geringe Proliferationsrate induziert. Wie erwartet, zeigt Con A nur bei Konzentrationen kleiner als 1 µg/ml signifikante mitogene Eigenschaften.

3.2.2. In vitro-Aktivierung von T-Lymphozyten durch Lipoprotein und seine synthetischen Analoga

Die Ergebnisse aus Stimulationsexperimenten mit Lymphozyten nackter Mäuse weisen darauf hin, daß es sich bei der unspezifischen Aktivierung dieser Zellen durch Lipoprotein wie auch seiner synthetischen Verbindungen um einen T-Zell-unabhängigen Vorgang handelt. Da jedoch auch nackte Mäuse eine geringe Anzahl immunkompetenter T-Lymphozyten aufweisen, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei nicht um eine reine B-Zell-Antwort handelt. So konnte Raff 1971 zeigen, daß eine geringe Anzahl cytotoxischer T-Lymphozyten auch bei thymuslosen Mäusen vorkommt, und daß ihre Lymphknotenzellen ein Serum, das gegen die Oberfläche von T-Lymphozyten gerichtet ist, absorbieren können (71).

3.2.2.1. In vitro-Aktivierung von Thymozyten durch E. coli Lipoprotein, E. coli Lipopolysaccharid und Concanavalin A

Die Experimente aus Kapitel 3.2.1. zeigten, daß Lipoprotein und seine auf synthetischem Weg dargestellten Verbindungen Zellen nackter Mäuse zur Synthese von DNA induzieren, und daß daran höchstwahrscheinlich keine T-Zellen beteiligt sind. Um diesen Befund zu erhärten, wurden Thymozyten als Quelle einer reinen T-Lymphozytenpopulation mit Lipoprotein im Stimulatonstest eingesetzt. Diese Thymuszellen bestehen zum größten Teil aus T-Vorläuferzellen, die im Thymusgewebe ihre weitere Ausdifferenzierung zu immunkompetenten T-Lymphozyten erfah-

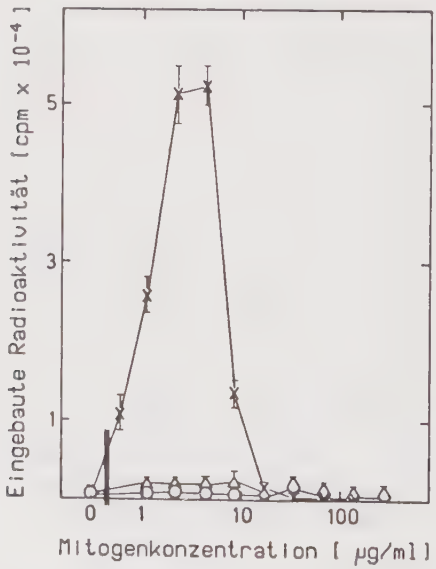


Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Thymozyten von Balb/c-Mäusen nach 48 h Inkubation mit E. coli Lipoprotein (O), E. coli Lipopolysaccharid (△) und Concanavalin A (×). Die Markierung erfolgte zwischen der 24. und 48. Stunde des Tests. Jeder Punkt repräsentiert die Durchschnittswerte ± SD von drei Messwerten.

ren. Die Thymozyten können in "cortisonsensitive" (die etwa 80 bis 98% aller Thymuszellen ausmachen), und in "cortisonresistente" Thymozyten unterteilt werden (72). Nur die cortisonresistenten Zellen, die den immunkompetenten Anteil der Zellen stellen, können durch Con A zur DNA-Synthese angeregt werden (39).

Die Inkorporation von ^{3}H-Thymidin in Thymozyten-DNA (vergleiche Abbildung 9) wurde durch Concanavalin A stark erhöht, während sowohl Lipoprotein als auch Lipopolysaccharid keinen nennenswerten Effekt zeigten, obwohl auch in Gegenwart dieser beiden Mitogene eine schwache Wirkung zu verzeichnen ist. Im Vergleich zur Con A-Antwort reagieren Thymozyten auf Lipoprotein und Lipopolysaccharid höchstens mit einer Stimulation unter 2%.

3.2.2.2. In vitro-Aktivierung von Thymozyten durch die synthetischen Analoga

Um feststellen zu können, ob auch die synthetisch hergestellten Lipoproteinderivate ein dem nativen Protein analoges Verhalten zeigen, wurden wie mit Lipoprotein Stimulationsexperimente mit Thymozyten in Gegenwart dieser Verbindungen durchgeführt.

Im Gegensatz zur Stimulation durch Con A, die auch in diesem Experiment als Kontrolle diente, zeigen sowohl Tripalmitoylcystein als auch Tripalmitoylpentapeptid bei Thymozyten nur einen marginalen Stimulationseffekt. Während bei Concanavalin A am Stimulationsoptimum bei 4 µg/ml eine Erhöhung der Einbaurate von markiertem Thymidin um mehr als das 200fache auftritt, liegen die Stimulationsindices von Tripalmitoylcystein bei etwas mehr als 2, bzw. von Tripalmitoylpentapeptid bei etwa 5 (kein definiertes Optimum zu erkennen, siehe Abbildung 10).

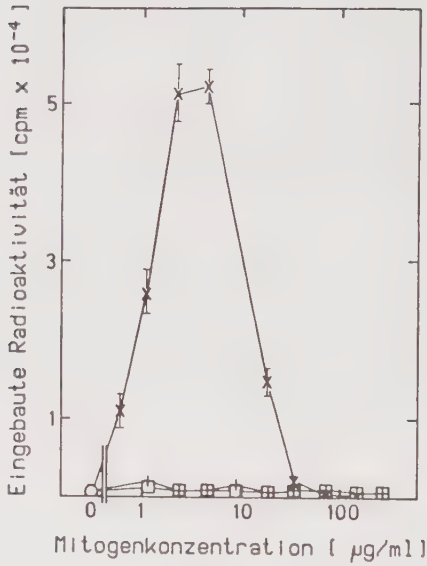


Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Thymozyten von Balb/c-Mäusen nach 48h Inkubation mit Tripalmitoylpentapeptid (□), Tripalmitoylcystein (+) und Concanavalin A (×). Die Markierung erfolgte zwischen der 24. und 48. Stunde des Tests. Jeder Punkt repräsentiert die Durchschnittswerte ± SD von drei Messwerten.

3.2.3. In vitro-Aktivierung von Lymphknotenzellen durch Escherichia coli Lipoprotein und Tripalmitoylpentapeptid

Wie die Milz zählen auch die Lymphknoten zu den sekundären lymphatischen Organen, deren komplexe Struktur ganz darauf ausgerichtet ist, eingedrungene Fremdstoffe abzufangen, und den auf sie ansprechenden Zellen in geeigneter Form zu präsentieren. Beide Organe besitzen vergleichbare Anteile an B-Lymphozyten (ca. 30 - 50%) und an T-Lymphozyten (ca. 50 - 70%). Da ihnen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen zukommt, erscheint es interessant zu untersuchen, inwieweit Zellen aus Lymphknoten auf mitogene Reize mit erhöhter Proliferation reagieren können.

Deshalb wurden Lymphknoten aus den mesenterialen Geweben von Balb/c-Mäusen isoliert und mit Lipoprotein bzw. Tripalmitoylpentapeptid über 48 h im Stimulationsansatz untersucht. Eine Dosis-Wirkungskurve der beiden Mitogene ist in Abbildung 11 dargestellt.

Sowohl Lipoprotein als auch sein synthetisches Pendant induzieren bei Lymphknotenzellen eine Erhöhung der DNA-Synthese, wie aus der Menge an eingebautem ^{3}H-Thymidin zu ersehen ist. Bei einer Konzentration um 70 µg/ml weist Lipoprotein ein markantes Optimum auf, bei höheren Mitogendosen geht die Einbaurate jedoch stark zurück. In Gegenwart von Tripalmitoylpentapeptid nimmt die Inkorporation des radioaktiven Materials mit steigender Mitogenkonzentration annähernd linear zu. Ein Stimulationsmaximum ist nicht erkennbar. Wird Tripalmitoylcystein als Stimulans auf Zellen von Mesenteriallymphknoten eingesetzt, ist keine mitogene Aktivität zu beobachten (unveröffentlichte Ergebnisse).

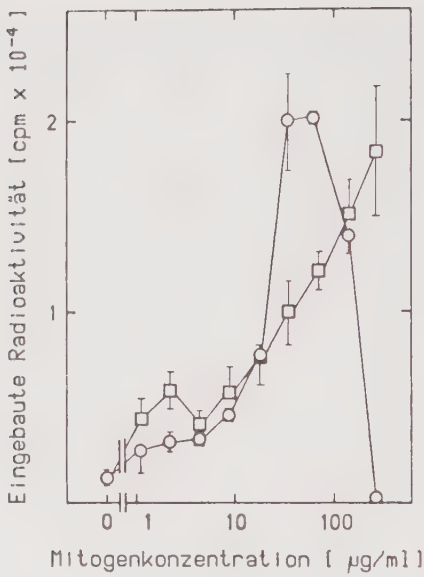


Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von Zellen der mesenterialen Lymphknoten von Balb/c-Mäusen ($1{,}4 \cdot 10^{6}$ Zellen pro Ansatz) nach 48h Inkubation mit E. coli Lipoprotein (○) und Tripalmitoylpentapeptid (□). Die Markierung erfolgte zwischen der 24. und 48. Stunde des Tests.

3.2.4. In vitro-Aktivierung von Lymphozyten des peripheren Bluts von Balb/c-Mäusen durch E. coli Lipoprotein und seine synthetischen Analoga

Untersuchungen zur Mitogenität von LPS auf Humanlymphozyten aus peripherem Blut (PBL) zeigten, daß keine oder nur eine schwache Proliferationsrate induziert wird (73, 74, 75) obwohl LPS als polyklonaler Aktivator von Lymphozyten bekannt ist (36, 62). Ähnliche Befunde konnten auch für Lipoprotein aus E. coli (76) und S. thyphimurium (Dr. B. Johnson, Tübingen, persönliche Mitteilung) gemacht werden.

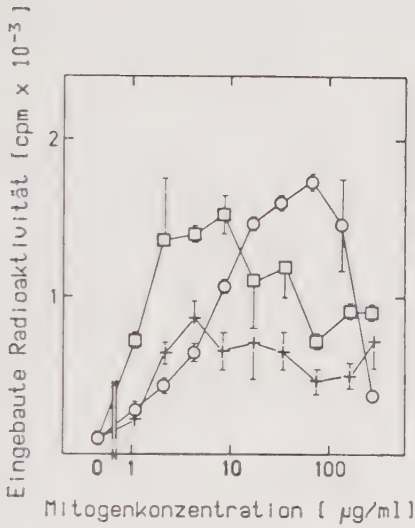


Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA von PBL von Balb/c-Mäusen nach 72h Inkubation mit E. coli Lipoprotein (○), Tripalmitoylpentapeptid (□) und Tripalmitoylcystein (+). Pro Ansatz wurden 1,4 · 10^{5} Zellen eingesetzt. Die Markierung erfolgte in den letzten 24 Stunden des Testansatzes.

Die Wirkung von Lipoprotein und der synthetischen Verbindungen wurde deshalb auf Lymphozyten des peripheren Bluts von Balb/c-Mäusen untersucht (Abbildung 12).

Lipoprotein aus Escherichia coli stimuliert PBL-Zellen über einen breiten Konzentrationsbereich von 10 - 100 µg/ml maximal. Niedrigere oder höhere Konzentrationen zeigen einen geringeren Effekt.

Im Gegensatz dazu ist das Stimulationsoptimum für das synthetische Tripalmitoylpentapeptid in Richtung niedrigerer Mitogenkonzentrationen verschoben. Die höchsten Einbauraten liegen in diesem Fall zwischen 2 - 10 µg/ml.

Tripalmitoylcystein kann ebenfalls Zellen des peripheren Bluts zu einer gesteigerten DNA-Synthese anregen, doch ist die Stimulation im Vergleich zu den oben beschriebenen Mitogenen deutlich schwächer.

Lipoprotein und die synthetischen Analoga stimulieren Milzzellpopulationen verschiedener Mäuseinzuchtstämme unspezifisch zu vermehrter Proliferation. Experimente mit congenisch thymuslosen Mäusen und Ergebnisse mit Thymozytenpopulationen lassen den Schluß zu, daß es sich hierbei um B-Zell-Mitogene handelt. Weiterhin sind das Protein und seine künstlich dargestellten Derivate in der Lage, Lymphozyten aus anderen Quellen als der Milz, wie z.B. aus Lymphknotenzellen und Leukozyten des peripheren Bluts zur Inkorporation von radioaktiven Nucleotiden anzuregen.

٢-١- [illegible]

[illegible]

3.3.1. Abhängigkeit der mitogenen Antwort von der Dosis des in vivo verabreichten Materials

3.3.1.1. Dosis-Wirkungskurve für Lipoprotein aus Escherichia coli bei der Stimulation in vivo

Die Effekte von E. coli Lipoprotein auf Milzzellen von Balb/c-Mäusen in vivo in Abhängigkeit von der intravenös verabreichten Dosis zeigen sich bereits drei Tage nach der Gabe des Mitogens. Dann ist eine deutliche Erhöhung der Milzgewichte individueller Mäuse (siehe Abbildung 13), und, damit verbunden, eine Zunahme der Anzahl der in den Milzen der Tiere befindlichen Zellen (Tabelle 1) zu erkennen.

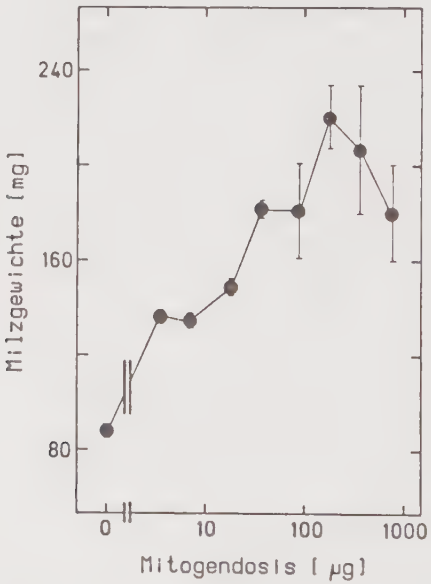


Abbildung 13: Dosis-Abhängigkeit der Milzvergrößerung in vivo nach Gabe von E. coli Lipoprotein. Gruppen von je zwei Balb/c-Mäusen wurden drei Tage vor dem Test mit steigenden Mengen Lipoprotein intravenös gespritzt. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert die mittleren Milzgewichte ± Standardabweichung. Nach 35 µg LPS werden Milzgewichte von 226 ± 55 mg beobach-

Tabelle 1: Zunahme der Zellzahlen nach intravenöser Gabe verschiedener Mengen von E. coli Lipoprotein

Verabreichte Mitogenmenge pro Maus [µg]	Zellzahl pro Milz
0,0	$4,5 \cdot 10^7$
3,5	$10,5 \cdot 10^7$
7,0	$9,3 \cdot 10^7$
18,0	$8,0 \cdot 10^7$
35,0	$8,0 \cdot 10^7$
88,0	$8,8 \cdot 10^7$
175,0	$8,0 \cdot 10^7$
350,0	$13,0 \cdot 10^7$
700,0	$7,0 \cdot 10^7$
35 µg LPS (Difco)	$8,5 \cdot 10^7$

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, verdoppelt sich im Durchschnitt die Anzahl der Milzzellen im Vergleich zur Zellzahl unbehandelter Tiere, ein gleicher Effekt ist nach Verabreichung von 35 µg Lipopolysaccharid zu verzeichnen.

Die Milzgewichte hingegen steigen mit zunehmender Dosis annähernd linear an. Bereits durch Injektion von nur 3,5 µg Lipoprotein wird eine mehr als 1,5fache Organgröße erreicht. Zusätzlich zur Vergrößerung der Milzen kann Lipoprotein deren B-Lymphozyten zur Immunglobulinsekretion anregen (Abbildung 14).

Die polyklonale Natur dieser Aktivierung ist ersichtlich aus der Zunahme der Anzahl der gegen TNP-beschichtete Schafserythrozythen plaquebildenden Zellen (vergleiche Kapitel 2.4.4.2.). Dabei tritt eine Anzahl verschiedener Maxima auf. Bereits bei 3,5 µg Lipoprotein pro Tier wird eine 3fach höhere Immunglobulinsekretion erreicht. Bei einer Gabe von 35 µg ist die polyklonale Immunantwort 10fach erhöht, bei 175 µg 8fach. Zwischen den oben genannten Dosen tritt jeweils eine Abnahme der gegen TNP gerichteten Immunantwort auf. Mit der polyklonalen Immunreaktion gegen TNP-beschichtete Erythrozyten ist eine Reaktion gegen unbeschichtetes Hammelblut kor-

reliert, die insgesamt jedoch wesentlich schwächer ist. In Übereinstimmung mit der in vitro beobachteten Induktion einer verstärkten Proliferation von Milzzellen tritt auch nach intravenöser Injektion steigender Mengen Lipoprotein ein erhöhter Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA dieser Zellen auf. Das gleiche gilt für den Einbau von radioaktivem Leucin bzw. Uridin (Abbildung 15). Bei der Synthese von Protein und DNA bzw. RNA ist wiederum (wie bei den Milzgewichten) bis zu einer Konzentration von 350 µg Lipoprotein eine annähernd lineare Beziehung zur Mitogengabe zu erkennen.

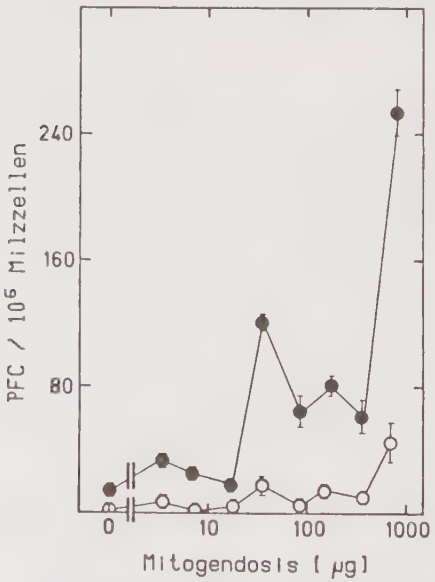


Abbildung 14: Dosis-Abhängigkeit der polyklonalen B-Zell-Antwort in den Milzen von Lipoproteinbehandelten Balb/c-Mäusen. Gruppen von je zwei Tieren wurden drei Tage vor dem Test steigende Mengen Lipoprotein intravenös gespritzt. Die Milzzellen jeder Gruppe wurden gepoolt und die Anzahl der gegen unbehandelte (○) bzw. TNP-beschichtete (●) Erythrozyten plaquebildenden Zellen bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die durchschnittliche Anzahl von PFC ± SD von vier Bestimmungen.
Vergleichswerte: Anzahl plaquebildender Zellen nach 3tägiger Exposition mit LPS:

TNP-PFC : 114 ± 5

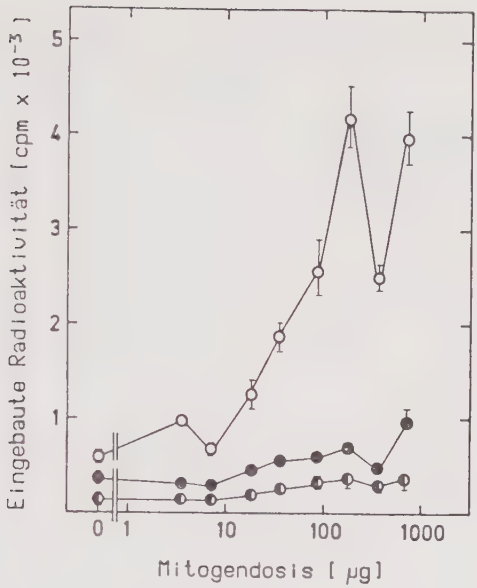


Abbildung 15: Einbau von ^{3}H-Thymidin (○), ^{3}H-Uridin (◐) und ^{3}H-Leucin (●) in die in vivo mit Lipoprotein stimulierten Zellen (vergleiche Legende zu Abbildung 14). 5,3 · 10^{5} Zellen wurden für 24h nach Entnahme aus den Tieren markiert. Jeder Punkt zeigt die durchschnittliche Einbaurate ± SD von zehn parallelen Ansätzen. Vergleichswerte : Radioaktiver Einbau nach 3tägiger Exposition mit 35 µg LPS in vivo:

^{3}H-Thymidin	: 2480 ± 304
^{3}H-Uridin	: 630 ± 49
^{3}H-Leucin	: 352 ± 25

3.3.3.1.2. Dosis-Wirkungskurve von Tripalmitoylpentapeptid in vivo

Um festzustellen, ob Tripalmitoylpentapeptid die gleiche Dosis-Wirkungskurve wie das native Lipoprotein in vivo zeigt, wurde Balb/c-Mäusen Tripalmitoylpentapeptid in steigenden Dosen injiziert. Sie wurden nach Ablauf von drei Tagen auf mitogene Aktivierung von B-Lymphozyten hin untersucht. Abbildung 16 macht deutlich, daß auch diese Verbindung eine Vergrößerung der Milzen

Tabelle 2: Zunahme der Zellzahlen nach intravenöser Gabe verschiedener Mengen von Tripalmitoylpentapeptid

Verabreichte Mitogenmenge pro Maus [µg]	Zellzahl pro Milz
0,0	$3,6 \cdot 10^7$
3,5	$10,4 \cdot 10^7$
7,0	$11,3 \cdot 10^7$
18,0	$10,0 \cdot 10^7$
35,0	$8,3 \cdot 10^7$
88,0	$9,3 \cdot 10^7$
175,0	$8,4 \cdot 10^7$
350,0	$11,0 \cdot 10^7$
35 µg LPS (Difco)	$9,3 \cdot 10^7$

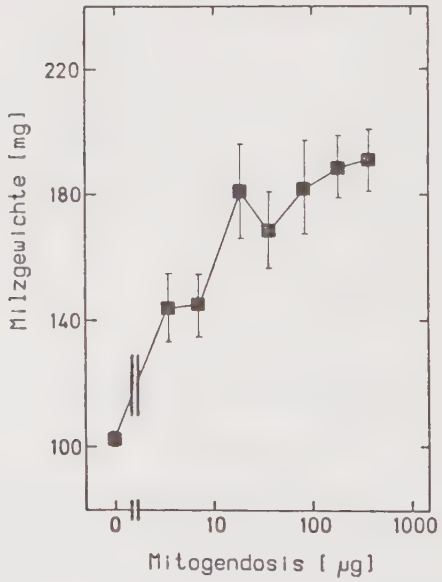


Abbildung 16: Dosis-Abhängigkeit der Milzvergrößerung in vivo nach Gabe von Tripalmitoylpentapeptid. Gruppen von je zwei Balb/c-Mäusen wurden drei Tage vor dem Test mit steigenden Mengen Lipoprotein intravenös gespritzt. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert die mittleren Milzgewichte ± Standardabweichung. Nach 35 µg LPS werden Milzgewichte von 226 ± 55 mg beobachtet.

hervorruft. Wie dieser Versuchsreihe zu entnehmen ist, wird bereits bei einer Mitogengabe von 3,5 µg pro Maus eine Zunahme der Milzgewichte um mehr als das 1,4fache erzielt, was in guter Übereinstimmung mit dem für natives Lipoprotein gefundenen Wert steht. Mit zunehmender TPP-Gabe erhöhen sich hierbei die Milzgewichte der Tiere linear.

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, steigt die Anzahl der Milzzellen nach einer Stimulation mit Tripalmitoylpentapeptid in vivo etwa um den Faktor 2 gegenüber un-

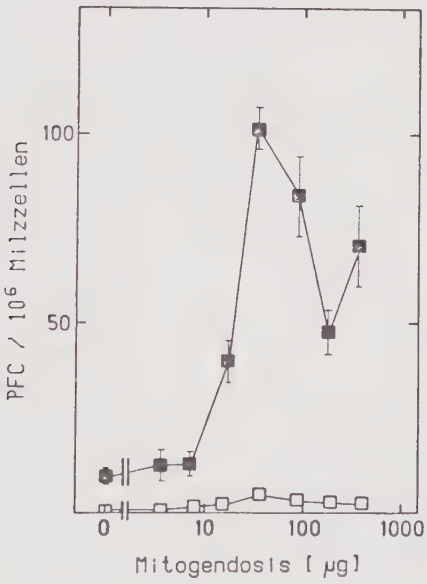


Abbildung 17: Dosis-Abhängigkeit der polyklonalen B-Zell-Antwort in den Milzen von Lipoproteinbehandelten Balb/c-Mäusen. Gruppen von je zwei Tieren wurden drei Tage vor dem Test steigende Mengen Lipoprotein intravenös gespritzt. Die Milzzellen jeder Gruppe wurden gepoolt und die Anzahl der gegen unbehandelte (○) bzw. TNP-beschichtete (●) Erythrozyten plaquebildenden Zellen bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die durchschnittliche Anzahl von PFC ± SD von vier Bestimmungen.
Vergleichswerte : Anzahl plaquebildender Zellen nach 3tägiger Exposition mit LPS:

TNP-PFC	:	141 ± 16
SRBC-PFC	:	8 ± 4

behandelten Tieren an. Das gleiche gilt für die als Kontrolle geltende LPS-Gruppe. Mit einer Vergrößerung der lymphatischen Organe der Balb/c-Mäuse geht eine Aktivierung von B-Lymphozyten zur Antikörpersekretion einher. Im wesentlichen gleicht die polyklonale Immunantwort auf das synthetische Lipopeptid der auf natives Protein (vergleiche Abbildung 17).

Graduelle Unterschiede treten hingegen bei der Lage der Stimulationsoptima auf. Während bei der niedrigsten Mitogendosis praktisch keine Erhöhung der Synthese von Immunglobulin gegen Trinitrophenol zu verzeichnen ist, tritt bei 35 µg eine 10fache Steigerung gegenüber unbehandelten Kontrolltieren auf. Bei höheren TPP-Injektionen liegt die erreichte Zahl plaquebildender Milzzellen deutlich niedriger. Erst wenn mehr als 700 µg intravenös verabreicht werden, steigt die Immunantwort wieder an. Ein ähnliches Verhalten weist die gegen unbeschichtete Erythrozyten gerichtete Immunantwort auf.

3.3.2. Aktivierung von B-Lymphozyten durch Lipoprotein und seine synthetischen Analoga bei verschiedenen Mäusestämmen *in vivo*

Da die Untersuchungen zur Dosis-Wirkungsbeziehung ein klares Maximum der polyklonalen Immunantwort bei 35 µg Mitogen pro Tier ergaben, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit diese Menge zur Stimulation von Milzzellen *in vivo* eingesetzt. Außerdem ist bei dieser Konzentration die im nativen Lipoprotein enthaltene Lipopolysaccharidkontamination von ca. 3% (d.h. von ca. 1 µg/Tier bei 35 µg Mitogeneinsatz) noch vernachlässigbar.

3.3.2.1. Stimulation von Balb/c-Lymphozyten

In einigen dieser Versuchsreihen wurde zusätzlich zu den TNP-gekoppelten Schafserythrozyten mit Protein-A beschichtes Hammelblut in die Tests eingeführt. Protein A hat die Fähigkeit, Antikörper mit ihrem F_c-Teil zu binden. Deshalb haben Plaquetests mit Protein A den Vorteil, daß sie gleichzeitig alle synthetisierten Antikörper, also auch die spezifischen, in den Test einbeziehen, während TNP-Plaquetests nur die polyklonale Aktivierung von Lymphozyten erfassen.

Milzzellen von Balb/c-Mäusen sind durch Lipopolysaccharid mitogen stimulierbar. LPS ist gleichzeitig für seine Fähigkeit bekannt, in vivo eine polyklonale Immunantwort zu induzieren (77, 78). Aus diesen Gründen wurden erste Versuche zur Wirkung von Lipoprotein in vivo mit diesem Inzuchtstamm durchgeführt. Als Kontrolle für die Lipoprotein-Effektivität in vivo wurden die Tiere in gleicher Weise mit Lipopolysaccarid behandelt und die beiden Ergebnisse verglichen.

Tabelle 3 faßt die Ergebnisse aus drei repräsentativen Experimenten zur Induktion der Immunglobulinsynthese in vivo zusammen. Auch in diesen Experimenten stimulieren alle eingesetzten Mitogene B-Lymphozyten zur polyklonalen Immunglobulinsynthese, wie aus den Werten der TNP-Plaquetests (Tabelle 3) zu entnehmen ist. Dabei weist Tripalmitoylpentapeptid eine dem nativen Lipoprotein vergleichbare, wenn auch etwas geringere Aktivität auf. Tripalmitoylcystein zeigt dagegen eine deutlich verminderte, aber immer noch signifikante Wirkung in vivo. Lipopolysaccharid wurde in allen in vivo-Experimenten zum Vergleich der Einzelversuchsreihen untereinander eingesetzt, da, wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist, verschiedene Plaquetests starke Varianzen untereinander aufweisen. Die Protein A-Tests ergeben ein den TNP-Plaquetests analoges Stimulationsverhalten, obwohl eine wesentlich größere Anzahl antikörperproduzierender Zellen erfaßt werden kann. Alle Mitogene wirken sich auch

auf die Größe der Milzen aus, wobei wiederum Lipoprotein am stärksten stimuliert, gefolgt von Tripalmitoylpentapeptid und, mit der schwächsten Wirkung, von Tripalmitoylcystein.

Tabelle 3: Vergleich der Stimulation von Milzzellen aus Balb/c-Mäusen mit verschiedenen Mitogenen in vivo

Mitogen a)	Exp. Nr.	Milzgewicht [mg]	plaque-forming cells gegen TNP-SRBC pro 10^6 Milzz.	plaque-forming cells gegen SRBC pro 10^6 Milzz.	plaque-forming cells gegen Prot. A-SRBC pro $5 \cdot 10^4$ Milzz.
kein	1	105± 9	17± 1	1± 1	127±14
	2	143± 6	12± 3	0	58± 8
	3	101± 9	3± 2	0	n.d.
Lipoprot. aus E. coli	1	220±25	154±15	4± 2	588±95
	2	240± 2	96±15	6± 1	272±30
	3	172± 3	27± 2	2± 2	n.d.
Tripalmitoylpentapeptid	1	176±10	98±19	6± 1	683±27
	2	181±12	49± 8	2± 1	214±10
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tripalmitoylcystein	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	143± 4	24±10	1± 1	132±11
	3	120±20	15± 1	1± 1	n.d.
LPS b)	1	188±22	365±22	26± 5	1836±67
	2 c)	201±33	55± 8	5± 4	771±44
	3	195±12	121± 4	5± 3	n.d.

a) 35 µg jedes Mitogens wurde Gruppen von zwei Mäusen drei Tage vor dem Test intravenös gespritzt
b) Lipopolysaccharid von E. coli (Difco Laboratories)
c) intraperitoneal appliziert
n.d. = nicht durchgeführt

3.3.2.2. Polyklonale Stimulation von C3H/HeJ-Lymphozyten

Da Lipopolysaccharid mit den Proteinen der äußeren Membran von Bakterien assoziiert ist und gleichzeitig ein starkes B-Zell-Mitogen darstellt, könnte die Aktivität des nativen Lipoproteins *in vivo* zumindest teilweise auf eine LPS-Kontamination zurückzuführen sein. Deshalb wurde die Mitogenität von Lipoprotein aus *E. coli* zusätzlich an C3H/HeJ-Mäusen getestet, die als "low responder" gegen LPS bekannt sind (81). In Ergänzung der Experimente aus Kapitel 3.3.2.1 wurde gleichzeitig die Wirkung der synthetischen Verbindungen auf Milzzellen der C3H/HeJ-Tiere untersucht.

Tabelle 4: Vergleich der *in vivo*-Stimulation verschiedener Mitogene in den Milzen von C3H/HeJ-Mäusen

Mitogen a)	Milzgewicht [mg]	TNP-PFC pro 10^6 Milzz.	SRBC-PFC pro 10^6 Milzz.	Zellzahl pro Milz
kein	127 ± 1	6 ± 2	0	$1{,}3 \cdot 10^8$
E. coli FLP	227 ±15	55 ± 7	2 ± 1	$2{,}8 \cdot 10^8$
Tripalmitoyl-pentapeptid	211 ±20	28 ± 4	3 ± 2	$2{,}6 \cdot 10^8$
Triplamitoyl-cystein	178 ±14	28 ± 5	1 ± 1	$1{,}4 \cdot 10^8$
E. coli LPS b)	177 ±13	25 ± 3	1 ± 1	$2{,}1 \cdot 10^8$

a) Jeweils 35 µg wurde Gruppen von 2 Mäusen 3 Tage vor dem Test gespritzt.
b) Lipopolysaccharid aus *E. coli*, Präparation nach der Methode von Westphal (100) (von Herrn Dr. W. Scheuer).

Alle Mitogene induzieren eine Vergrößerung der Milzen sowie eine Vermehrung ihrer Zellzahl. Beides ist bereits am dritten Tag nach der Injektion nachweisbar.

Betrachtet man die Anzahl der gegen TNP-beschichtete Erythrozyten plaquebildenden Zellen, zeigt sich, daß freies Lipoprotein aus dem Bakterienstamm Escherichia coli B/r eine 10fach höhere Anzahl polyklonal stimulierter Zellen induziert. Demnach gehen die beobachteten Effekte von isoliertem Lipoprotein in vivo nicht allein auf LPS-Verunreinigungen zurück. Sowohl die beiden synthetischen Verbindungen als auch LPS stimulieren B-Zellen nur um den Faktor 5.

Man erhält ein Bild das die in vivo-Vorgänge besser beschreibt, wenn man die Anzahl der immunglobulinsekretierenden Zellen in den Gesamtmilzen berechnet. Damit erhält man die "echte" Zunahme der Immunglobulinproduktion pro Tier, da nicht nur der relative Anteil stimulierter Zellen, sondern außerdem die Gesamtzellzahl zunimmt.

Tabelle 5: Durchschnittliche Anzahl polyklonal stimulierter B-Zellen in den Milzen von C3H/HeJ-Mäusen

Mitogen a)	TNP-PFC pro Milz
kein	780
E. coli FLP	15400
Tripalmitoyl-pentapeptid	7280
Triplamitoyl-cystein	3920
E. coli LPS	5250

a) Jeweils 35 µg wurde Gruppen von 2 Mäusen 3 Tage vor dem Test gespritzt.

Durch diese Berechnungsmethode wird die stimulierende Wirkung aller eingesetzter Mitogene deutlich. So sind die beiden Lipoproteinanaloga ebenfalls in der Lage, eine Steigerung der Anzahl aktivierter B-Zellen hervorzurufen, das gleiche gilt auch für Lipopolysaccharid.

3.3.2.3. Polyklonale Stimulation der Milzzellen thymusloser Tiere

Zur Klärung der Frage, welche Zellpopulation durch Lipoprotein und den Analoga *in vivo* polyklonal stimuliert wird, wurde thymuslosen Mäusen jeweils 35 µg *in vivo* appliziert und die anti-TNP- und anti-SRBC-Aktivität ihrer Milzen bestimmt. In diesen Experimenten wurden die individuellen Mäuse getrennt getestet.

Die Lymphozyten nackter Mäuse werden in vergleichbarer Weise durch Lipoprotein bzw. Tripalmitoylpentapeptid zur Differenzierung und Antikörpersynthese induziert (vergl. Tabelle 6a und 6b), wie dies bereits für Tiere der Inzuchtstämme von Balb/c und C3H/HeJ gezeigt werden konnte. Somit scheint es sich bei der hier durch Mitogen hervorgerufenen B-Zell-Antwort um einen T-Zell-unabhängigen Prozeß zu handeln.

Tabelle 6: Polyklonale Stimulation von Milzzellen zweier "nackter" Mäusestämme durch Lipoprotein und Tripalmitoylpentapeptid

Tabelle 6a: Ergebnisse für STU /nu-Mäuse b)

Mitogen a)	Milzgewicht [mg]	TNP-PFC pro 10^6 Milzzellen	SRBC-PFC pro 10^6 Milzzellen
kein	38 80	3 ± 2 6 ± 2	0 ± 0 1 ± 2
LPS aus E. coli	252 200	66 ± 7 120 ± 9	8 ± 4 9 ± 2
Tripalmitoyl-pentapeptid	148 144	51 ± 7 38 ± 5	6 ± 4 2 ± 3

Tabelle 6b: Ergebnisse für C3H/Tif/Bom-nu nu-Mäuse

Mitogen a)	Milzgewicht [mg]	TNP-PFC pro 10^6 Milzzellen	SRBC-PFC pro 10^6 Milzzellen
kein	95 65 65	52 ± 9 26 ± 2 45 ±10	11 ± 4 7 ± 3 8 ± 3
LPS aus E. coli	109 112	130 ±16 218 ±14	16 ±11 30 ±14
Tripalmitoyl-pentapeptid	93 119	98 ±11 184 ±20	3 ± 1 17 ±10

a) Jeweils 35 µg Mitogen wurde drei Tage vor dem Test appliziert.

b) Dieser Mäusestamm wurde von Herrn Dr. E. Spindler (Friedrich Miescher Laboratorium, Tübingen, Labor Prof. Dr. Anderer) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.3.3. Kinetik der polyklonalen Immunantwort in vivo

3.3.3.1. Kinetik der polyklonalen Antwort auf E. coli Lipoprotein

Um den zeitlichen Verlauf der polyklonalen Antwort nach Lipoproteingabe zu klären, wurden Gruppen von je 2 weiblichen Balb/c-Mäusen mit 35 µg Lipoprotein intravenös zwei, drei, vier, fünf, sieben und neun Tage vor dem Test immunisiert. Die daraus resultierende Vergrößerung der Milzen ist schon nach 48 Stunden sichtbar, er-

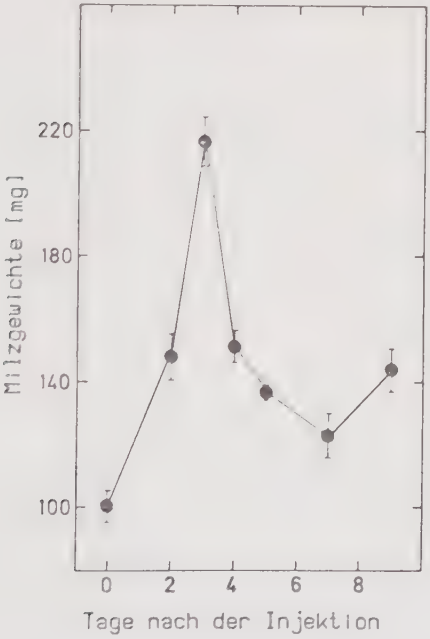
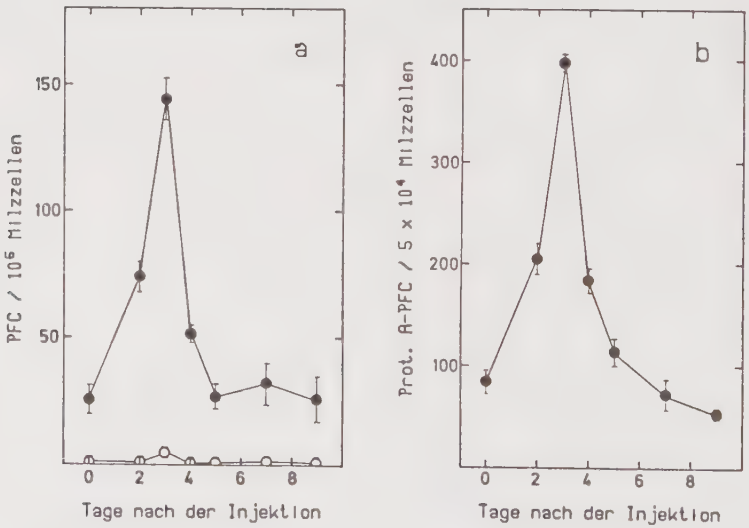


Abbildung 18: Kinetik der durch Lipoprotein aus E. coli induzierten Gewichtsveränderungen der Milzen von Balb/c-Mäusen. Jeweils zwei Tiere wurden zwei, drei, vier, fünf, sieben und neun Tage vor dem Test mit 35 µg Lipoprotein immunisiert. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert das durchschnittliche Milzgewicht ± SD. Nach 3tägiger Immunisierung mit 35 µg LPS (Difco) wurde ein Milzgewicht von 187 ± 5 mg beobachtet.

reicht ein ausgeprägtes Maximum 72 Stunden nach der Injektion, und klingt dann rasch wieder ab. Am 9. Tag nach der Mitogengabe ist wieder ein leichter Anstieg der Organgewichte zu verzeichnen (Abbildung 18).

Ebenfalls ist eine um den Faktor 2 vermehrte Zellzahl der Milzen festzustellen (Tabelle 7). Die Ausdifferenzierung der B-Lymphozyten zu antikörpersekretierenden Plasmazellen folgt dem oben angeführten Prozeß. Beide Veränderungen treten sehr früh auf, mit einem Optimum am dritten Tag, und sind nur von relativ kurzer Dauer. Dies gilt sowohl für die anti-TNP- bzw. anti-SBRC-Antwort der Milzzellen (Abbildung 19a) wie auch für eine anti-Pro-



Abbildungen 19a und 19b: Kinetik der polyklonalen B-Zell-Antwort in den Mäusen von Lipoproteinbehandelten Balb/c-Mäusen (siehe Legende zu Abbildung 18). Die Milzzellen jeder Gruppe wurden gepoolt und die Anzahl plaquebildenden Zellen ermittelt. Abbildung 19a zeigt die Ergebnisse mit unbehandelten (O) und TNP-beschichteten (●) Zellen, Abbildung 19b die Ergebnisse mit Protein A-SBRC.
Vergleichswerte : Anzahl plaquebildender Zellen nach 3tägiger Exposition mit LPS:

TNP-PFC	:	> 1660
SRBC-PFC	:	38 ± 6
Protein A-PFC	:	> 660

tein A-Aktivität (Abbildung 19b). Allerdings ist die leichte Zunahme des Organgewichts am neunten Tag nicht mit einer wieder zunehmenden Anzahl plaquebildender Zellen korreliert. Parallel zur Induktion von immunglobulinsynthetisierenden Zellen nach in vivo Priming entwikkelt sich eine erhöhte Proliferationsrate. Sie erreicht ihr Optimum ebenfalls am dritten Tag und reduziert sich mit zunehmender Immunisierungsdauer wieder auf den Kontrollwert nicht behandelter Tiere (Tabelle 7).

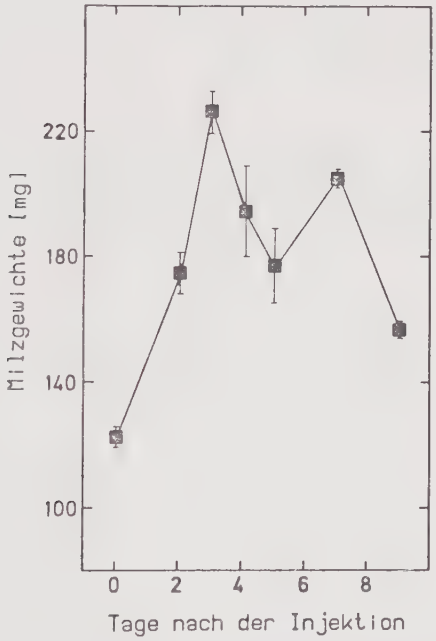


Abbildung 20: Kinetik der durch Tripalmitolypentapeptid aus E. coli induzierten Gewichtsveränderungen der Milzen von Balb/c-Mäusen. Jeweils zwei Tiere wurden zwei, drei, vier, fünf, sieben und neun Tage vor dem Test mit 35 µg Lipoprotein immunisiert. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Jeder Punkt repräsentiert das durchschnittliche Milzgewicht ± SD. Nach 3tägiger Immunisierung mit 35 ug LPS (Difco) wurde ein Milzgewicht von 182 ± 4 mg beobachtet.

Tabelle 7: Zunahme der Zellzahlen nach intravenöser Gabe von 35 µg Lipoprotein in Abhängigkeit von der Immunisierungsdauer

Immunisierungsdauer [Tage]	Zellzahl pro Milz
0	$6{,}5 \cdot 10^7$
2	$10{,}0 \cdot 10^7$
3	$11{,}4 \cdot 10^7$
4	$10{,}7 \cdot 10^7$
5	$11{,}8 \cdot 10^7$
7	$9{,}0 \cdot 10^7$
9	$10{,}0 \cdot 10^7$

Vergleichswert:
Zellzahl drei Tage nach Immunisierung mit 35 µg LPS (Difco Laboratories): $7{,}5 \cdot 10^7$

Tabelle 8: Proliferationsrate in vivo stimulierter Zellen mit unterschiedlicher Immunisierungsdauer. $4{,}4 \cdot 10^5$ Milzzellen wurden für 24 h nach Entnahme aus den immunisierten Tieren mit 0,6 µCi ^{3}H-Thymidin in Mikrotiterplatten (Falcon, flach) markiert. Jeder Wert gibt die durchschnittliche Einbaurate ± SD von 10 parallelen Ansätzen wieder.

Immunisierungsdauer [Tage]	eingebaute Radioaktivität [cpm]
0	1166 ± 35
2	1080 ± 60
3	2238 ± 170
4	1471 ± 207
5	996 ± 130
7	1352 ± 101
9	832 ± 121

Vergleichswert:
Eingebaute Radioaktivität nach dreitägiger Exposition mit 35 µg LPS (Difco Laboratories) 1626 ± 75 cpm

3.3.3.2. Kinetik der polyklonalen Antwort bei Tripalmitolylpentapeptid

Als Vergleich zu den in Kapitel 3.3.3.1 beschriebenen Versuchsreihen mit Lipoprotein aus E. coli wurden entsprechende Reihen mit dem von G. Jung und Mitarbeitern dargestellten Tripalmitoylpentapeptid gemessen. Es wurden abermals 35 µg intravenös in unterschiedlichen Zeitabständen gespritzt und die zu beobachtenden Veränderungen in den Milzen der Balb/c-Mäuse analysiert. Auch beim synthetischen Lipoproteinderivat machte sich schon 48 h nach der Immunisierung eine deutliche Gewichtszunahme im lymphatischen Organ bemerkbar. Es erreicht seine maximale Größe nach 72 h und verliert danach wieder an Gewicht. Sind die Tiere dagegen bereits sechs Tage der synthetischen Verbindung ausgesetzt, vollzieht sich eine erneute Vergrößerung der Milz, die aber rasch zurückgeht. Am 9. Tag nach der Injektion wird der geringste Größenunterschied gegenüber den Organen unbehandelter

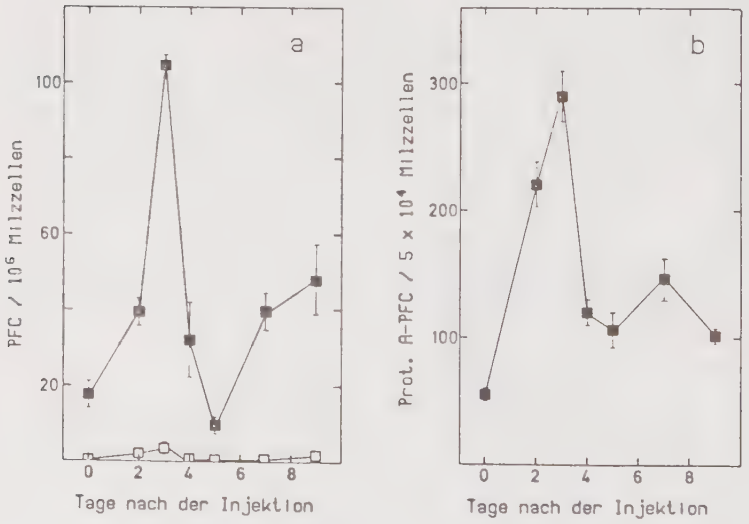
Tabelle 9: Zunahme der Zellzahlen nach intravenöser Gabe von 35 µg Tripalmitoylpentapeptid in Abhängigkeit von der Immunisierungsdauer

Immunisierungsdauer [Tage]	Zellzahl pro Milz
0	$8{,}0 \cdot 10^7$
2	$12{,}0 \cdot 10^7$
3	$16{,}5 \cdot 10^7$
4	$13{,}5 \cdot 10^7$
5	$16{,}5 \cdot 10^7$
7	$13{,}0 \cdot 10^7$
9	$9{,}0 \cdot 10^7$

Vergleichswert:
Zellzahl drei Tage nach Immunisierung mit 35 µg Tripalmitoylpentapeptid: $14{,}0 \cdot 10^7$

Kontrolltiere verzeichnet (Abbildung 20). Parallel zu dieser alternierenden Zu- und Abnahme der Milzgewichte steigt bzw. fällt auch die Anzahl der in den Organen gefundenen Zellen.

Ein ganz entsprechendes Bild bietet sich bei der Untersuchung der Induktion zur Antikörpersynthese von in vivo immunisierten Milzzellen. Nach 72 h ist die maximale Anzahl zur Immunglobulinsekretion befähigter B-Lymphozyten erreicht. Es folgt eine rasche Reduktion, und anschließend wieder ein Anstieg zu einem zweiten Maximum am siebten Tag (Abbildungen 21a und 21b). Dies trifft auch für die auf die Plaquezahl der Gesamtmilzen umgerechnete anti-TNP-Aktivität zu.



Abbildungen 21a und 21b: Kinetik der polyklonalen B-Zell-Antwort in den Mäusen von Tripalmitoylcysteinbehandelten Balb/c-Mäusen (siehe Legende zu Abbildung 20). Die Milzzellen jeder Gruppe wurden gepoolt und die Anzahl plaquebildenden Zellen ermittelt. Abbildung 21a zeigt die Ergebnisse mit unbehandelten (□) und TNP-beschichteten (■) Zellen, Abbildung 21b die Ergebnisse mit Protein A-SBRC.

Vergleichswerte : Anzahl plaquebildender Zellen nach 3tägiger Exposition mit LPS:

TNP-PFC	:	> 199 ± 38
SRBC-PFC	:	9 ± 2
Protein A-PFC	:	> 528 ± 43

3.3.4. Vergleich der primären und sekundären Immunantworten

Der dramatische Abfall der Immunantwort am dritten Tag nach der Induktion einer polyklonalen Antikörpersynthese läßt auf einen komplexen Regulationsmechanismus schließen. Um feststellen zu können, ob nach 72stündiger Immunisierung *in vivo* erneut eine Antwort der Milzlymphozyten gegen verschiedene Mitogene hervorgerufen werden kann, oder ob sich vielmehr die Kurzlebigkeit der Immunantwort im Verlust der Fähigkeit zur Proliferation *in vitro* widerspiegelt, wurden die Milzlymphozyten *in vivo* immunisierter Mäuse in Gegenwart von Mitogen *in vitro* restimuliert.

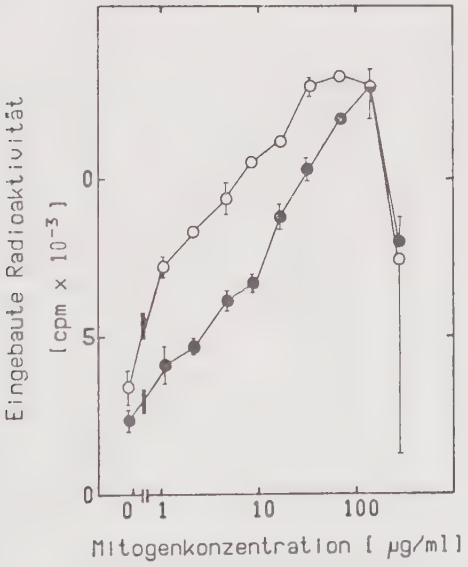


Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin bei der primären und sekundären Immunantwort. Balb/c-Mäuse wurden drei Tage vor dem Test mit je 35 µg Lipoprotein immunisiert und die Milzzellen nochmals für 48h *in vitro* mit Lipoprotein restimuliert (●). Als Vergleich dienten Zellen unbehandelter Tiere (○). Die Markierung erfolgte in den letzten 24h des Testansatzes.

3.3.4.1. Restimulation von Lymphozyten in vitro

3.3.4.1.1. Sekundäre Immunantwort bei Balb/c-Mäusen

Balb/c-Mäuse wurden drei Tage vor dem Test mit 35 µg Lipoprotein immunisiert. Den Tieren wurden die Milzen entnommen und ihre Lymphozyten abermals in vitro in Gegenwart verschiedener Mitogene inkubiert. Nach Ablauf von 24 h wurde für weitere 24 h mit ^{3}H-Thymidin markiert und die Proliferationsrate in Abhängigkeit der Mitogendosis ermittelt. Als Vergleich dienten Zellen von nicht immunisierten Kontrolltieren.

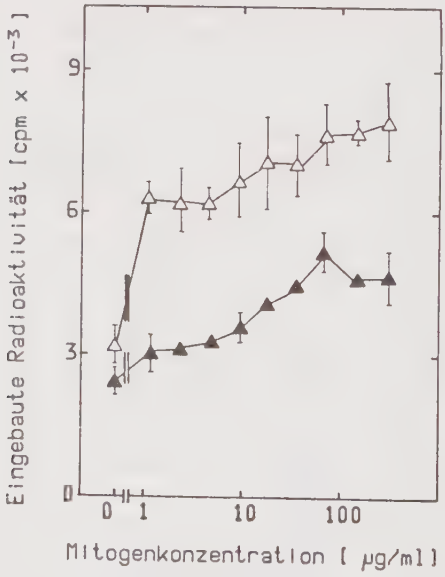


Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin bei der primären und sekundären Immunantwort. Balb/c-Mäuse wurden drei Tage vor dem Test mit je 35 µg Lipoprotein immunisiert und die Milzzellen für 48h in vitro mit Lipopolysaccharid restimuliert (▲). Als Vergleich dienten Zellen unbehandelter Tiere (△). Die Markierung erfolgte in den letzten 24h des Testansatzes.

Lipoproteinbehandelte Zellen, die abermals steigenden Mengen nativen Lipoproteins bzw. Lipopolysaccharids ausgesetzt werden, können wie unbehandelte Zellen mit einer Erhöhung der Proliferationsrate reagieren. Allerdings bauen immunisierte Zellen radioaktiv markiertes Thymidin in geringerem Maße in ihre DNA ein als die entsprechenden Kontrollzellen. Dies trifft nicht nur zu, wenn man sie mit B-Zell-Mitogenen wie Lipoprotein oder Lipopolysaccharid restimuliert, sondern auch, wenn man das T-Zell-Mitogen Con A verwendet (Abbildungen 22, 23, 24). Milzlymphozyten, die bereits mit Lipoprotein Berührung hatten, vermögen demnach bei einem zweiten Kontakt sowohl mit der gleichen als auch mit andersartigen Substanzen mit einer erhöhten Proliferationsrate zu antworten.

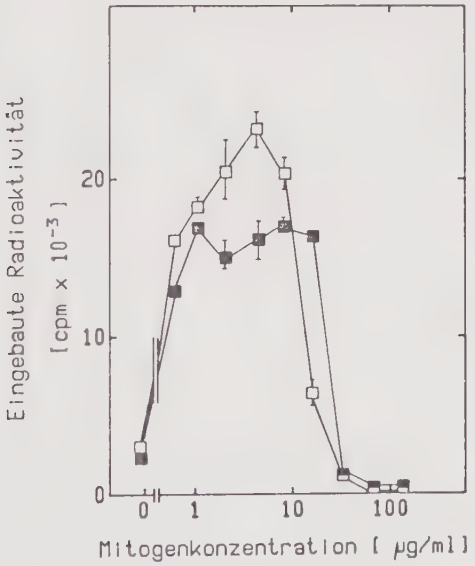


Abbildung 24: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin bei der primären und sekundären Immunantwort. Balb/c-Mäuse wurden drei Tage vor dem Test mit je 35 µg Lipoprotein immunisiert und die Milzzellen für 48h in vitro mit Concanavalin A restimuliert (■). Als Vergleich dienten Zellen unbehandelter Tiere (□). Die Markierung erfolgte in den letzten 24h des Testansatzes.

3.3.4.1.2. Sekundäre Immunantwort bei thymuslosen Mäusen

T-Zellen wurde eine besondere Rolle bei der oszillierenden Immunantwort auf LPS zugeschrieben (82, 83, 84). Bei athymischen Mäusen konnte, im Gegensatz zu euthymischen, nur ein Maximum der anti-PFC-Aktivität nach einer einmaligen Mitogeninjektion nachgewiesen werden (84, 85). Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob die in Abschnitt 3.3.4.1.1 beobachtete leichte Verringerung der sekundären Immunantwort nach Immunisierung in vivo von der Anwesenheit funktioneller T-Zellen abhängig ist,

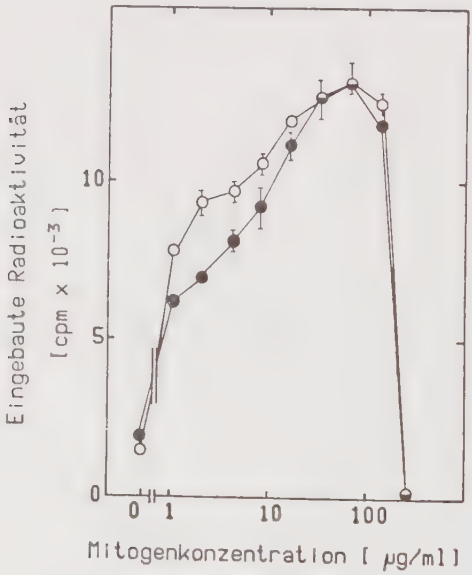


Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin bei der primären und sekundären Immunantwort. C3H/Tif/Bom-nu nu-Mäuse wurden drei Tage vor dem Test mit je 35 µg Lipoprotein immunisiert und die Milzzellen für 48h in vitro mit Lipoprotein restimuliert. Die geschlossenen Symbole stehen für die Restimulation geprimter Zellen, offene Symbole für die erstmalige Stimulation mit Lipoprotein.

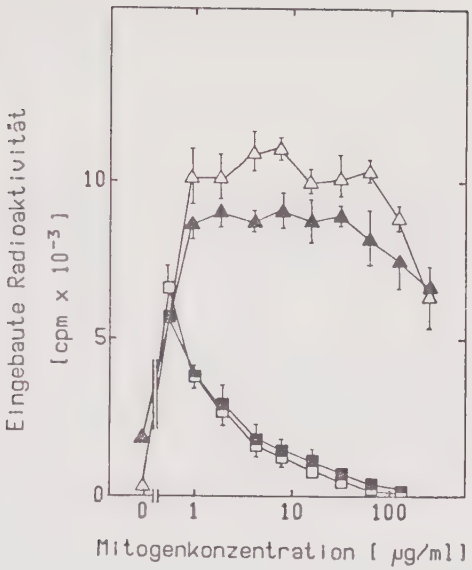


Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin bei der primären und sekundären Immunantwort. Vergleiche Legende zu Abbildung 25. Geschlossene Symbole stehen für Restimulation geprimter Zellen, offene Symbole für erstmalige Stimulation mit Lipopolysaccharid (△,▲) bzw. Concanavalin A (□,■).

wurden C3H/Tif/Bom-nu nu-Tiere 72 h vor einem in vitro-Test mit je 35 µg Lipoprotein immunisiert, ihre Milzen zur Einzelzellsuspension aufgearbeitet und die Lymphozyten nochmals für 48 h mit Mitogen behandelt. Die Abbildungen 25 und 26 machen deutlich, daß auch B-Lymphozyten immunisierter nackter Mäuse mit einer Proliferationsinduktion auf sekundären Kontakt mit Lipoprotein bzw. Lipopolysaccharid reagieren. Wie bereits für Lymphozyten von Balb/c-Mäusen gezeigt werden konnte, ist eine schwache Minderung des Einbaus von radioaktivem Material bei einer Mitogenkonzentration von weniger als 50 µg/ml gegenüber den Zellen unbehandelter Tiere zu verzeichnen. Keinen Unterschied weisen die Antworten der

Zellen auf das T-Zell-Mitogen Concanavalin A auf. Man erhält in diesem Fall für Mitogen-behandelte und naive Zellen annähernd identische Dosis-Wirkungskurven.

3.3.4.1.3. Sekundäre Immunantwort nach Auftrennung der Milzzellen in Einzelzellsuspensionen bei in vivo immunisierten Tieren

Balb/c-Mäuse wurden mit je 35 µg Lipopolysaccharid aus Escherichia coli immunisiert und die Milzzellen nach drei Tagen in Einzelpopulationen aufgetrennt. Als Kontrolle dienten nicht immunisierte Tiere. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. K. Stäb durchgeführt. Zur Trennung in die einzelnen Lymphozytenpopulationen wurden Milzzellsuspensionen mit geeignet verdünntem anti-Theta-Serum (H. Wagner, Mainz) bzw. Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulinserum (von Dr. R. B. Johnson zur Verfügung gestellt) und Komplement (Gibco, Wiesbaden) inkubiert (vergleiche Kapitel 2.6.) und somit T-, respektive B-Zellen aus den Lymphozytenkulturen eliminiert. Zur Kontrolle der Effizienz unseres Trennungsverfahrens wurden die Zellen mit Fluorescein-markierten anti-Maus-Immunglobulinseren inkubiert und die Reinheit der Lymphozytenpopulationen bestimmt. In der T-Zell-Population konnten keine fluoreszierenden Zellen mehr gefunden werden, während bei den mit anti-Theta-Serum inkubierten Zellen noch ca. 48% FITC-positiv waren (unveröffentlichte Ergebnisse). Die so charakterisierten Zellen wurden im Anschluß daran mit Lipopolysaccharid und Concanavalin A stimuliert. In Abbildung 27 ist das Ergebnis eines Zelltrennungsexperiments mit Kontrollzellen dargestellt, während die Abbildung 28 die Stimulation von vorimmunisierten Zellen wiedergibt. Sowohl Gesamtmilzzellen als auch T-Zell-freie Populationen antworten

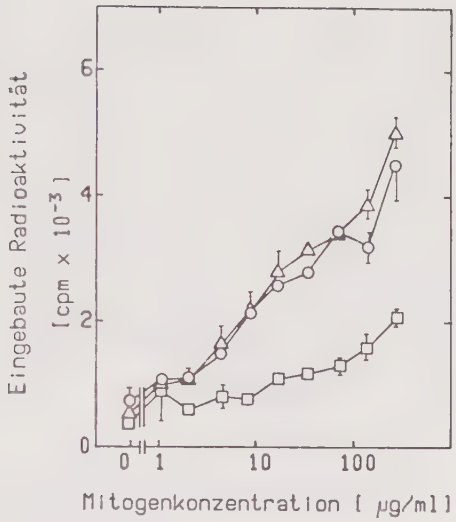


Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin bei der primären Immunantwort nach Auftrennung der Zellen in die Subpopulationen. Milzzellen von Balb/c-Mäusen wurden mit anti-Theta-Serum und Komplement (△) bzw. mit anti-Immunglobulinserum und Komplement (□) behandelt und mit Lipopolysaccharid für 48 h in vitro stimuliert. Im Vergleichsexperiment wurden unbehandelte Milzzellen eingesetzt (○).

in gleicher Weise auf eine Restimulation bzw. auf eine erstmalige Stimulation mit LPS. Lymphozytenpopulationen die zuvor mit anti-Immunglobulin-Serum und Komplement inkubiert wurden, vermögen dagegen nur mit deutlich verringerter Proliferationsaktivität auf die Gegenwart von Mitogen zu reagieren. Für die Beurteilung der Güte der Zelltrennung wurde in Ergänzung zur Stimulation mit LPS zusätzlich die Versuchsreihe mit Concanavalin A durchgeführt (vergleiche Abbildungen 29 und 30). Concanavalin A scheint auf Milzzellpopulationen und angereicherte T-Zellen einen identischen Effekt zu haben. Dagegen zeigen Lymphozyten, die an T-Zellen verarmt sind, nur noch eine vergleichsweise geringe Immunantwort gegen Concanavalin A.

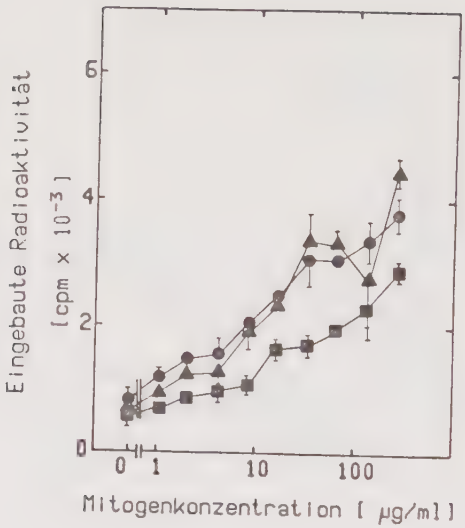


Abbildung 28: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA verschiedener Zellpopulationen in vivo immunisierter Milzzellen. Balb/c-Mäuse wurden 3 Tage vor dem Stimulationstest mit 35 µg Lipoprotein immunisiert. Die Auftrennung der Zellpopulationen erfolgte mit anti-Theta-Serum und Komplement (▲) bzw. anti-Immunglobulinserum und Komplement (■). Als Vergleichsexperiment wurden Gesamtmilzzellen eingesetzt (●). Zur Restimulation im in vitro-Test wurde Lipopolysaccharid verwendet.

3.3.4.2. Restimulation von Lymphozyten in vivo

Zur Klärung der Frage, welche Auswirkung eine sekundäre Mitogenexposition in vivo zeigt, wurden immunisierte Tiere einer zweiten Injektion unterzogen und die dadurch hervorgerufene polyklonale Immunantwort durch Plaquetests bestimmt.

3.3.4.2.1. Sekundäre Immunantwort auf Lipoprotein

Balb/c-Mäuse wurden sechs bzw. drei Tage vor dem Plaquetest mit jeweils 35 µg Lipoprotein intravenös immunisiert und nach Entnahme der Milzen die anti-TNP-

Aktivität der Lymphozyten im Plaquetest ermittelt. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse aus zwei Experimenten. Zum Vergleich mit bisherigen Befunden wurden Einfachimmunisierungen mit Lipoprotein am dritten und sechsten Tag, sowie mit Lipopolysaccharid am dritten Tag als Kontrollen eingeführt. Nach zweimaliger intravenöser Gabe von Lipoprotein im Abstand von drei Tagen kann keine Erhöhung der gegen TNP gerichteten Antikörpersynthese erzielt werden. Sie liegt merklich unter der Stimulationsrate einer einfachen Immunisierung, die drei Tage vor dem Test erfolgte.

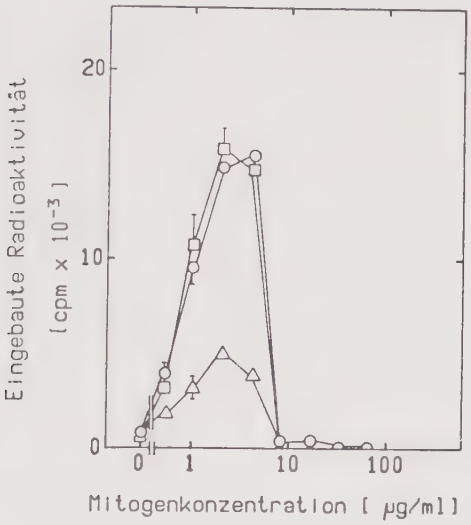


Abbildung 29: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin bei der primären Immunantwort nach Auftrennung der Zellen in die Subpopulationen. Milzzellen von Balb/c-Mäusen wurden mit anti-Theta-Serum und Komplement (△) bzw. mit anti-Immunglobulinserum und Komplement (□) behandelt und mit Concanavalin A für 48 h in vitro stimuliert. Im Vergleichsexperiment wurden unbehandelte Milzzellen eingesetzt (○).

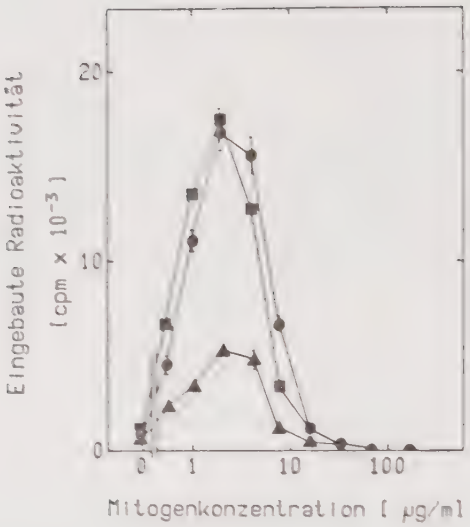


Abbildung 30: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA verschiedener Zellpopulationen in vivo immunisierter Milzzellen. Balb/c-Mäuse wurden 3 Tage vor dem Stimulationstest mit [illegible] µg Lipoprotein immunisiert. Die Auftrennung der Zellpopulationen erfolgte mit anti-Theta-Serum und Komplement (▲) bzw. mit anti-Immunglobulinserum und Komplement (■). Als Vergleichsexperiment wurden Gesamtmilzzellen eingesetzt (●). Zur Restimulation im in vitro-Test wurde Concanavalin A verwendet.

Tabelle 10: Sekundäre Immunantwort gegen Lipoprotein in vivo bei Balb/c-Mäusen. Jeweils 35 µg Mitogen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten intravenös appliziert.

	Experiment 1		Experiment 2	
Immunisierungs-protokoll	Milz-gewicht [mg]	IMP-PFC pro 10^6 Milzz.	Milz-gewicht [mg]	IMP-PFC pro 10^6 Milzz.
keine Immunisierung	98 ± 2	6 ± 2	114 ± 9	7 ± 4
Lipoprotein Tag 3	125 ± 9	31 ± 2	193 ± 6	88 ± 7
Lipoprotein Tag 3 und 6	158 ±38	17 ± 2	192 ±30	13 ± 4
Lipoprotein Tag 6	104 ± 9	23 ± 4	n.d.	n.d.
35 µg LPS Tag 3	163 ±21	273 ±10	187 ± 5	83 ± 2

n.d. = nicht durchgeführt

3.3.4.2.2. Sekundäre Immunantwort auf Tripalmityl-pentapeptid

Wie gezeigt werden konnte, hat das synthetische Pentapeptid sowohl in vitro als auch in vivo einen dem nativen Lipoprotein vergleichbaren Stimulationseffekt. Auch bei einer Restimulation bzw. bei einer Mehrfachstimulation im 72 h Rhythmus kann kein größeres Maß an polyklonaler B-Zell-Aktivierung erreicht werden. Wieder lagen die Stimulationsquoten deutlich niedriger als bei einer Immunisierung drei Tage vor erfolgtem Test (vergleiche Tabelle 11).

Tabelle 11: Sekundäre Immunantwort gegen Tripalmitoylpentapeptid in vivo bei Balb/c-Mäusen. Jeweils 35 µg Mitogen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten intravenös appliziert.

Immunisierungsprotokoll	Milzgewicht [mg] a)	TNP-PFC pro 10^6 Milzzellen a)	Prot. A-PFC pro $5 \cdot 10^4$ Milzzellen a)
keine Immunisierung	97 ±29	8 ± 2	36 ± 9
TPP Tag 3	158 ± 3	70 ± 6	120 ±20
TPP Tag 3 und 6	163 ± 9	38 ± 7	69 ±11
TPP Tag 6	139 ± 1	11 ± 3	36 ± 8
TPP Tag 3, 6, 12, 15	161 ±15	33 ± 3	96 ±28
35 µg LPS Tag 3	215 ±24	85 ± 9	236 ±31

a) Mittelwerte aus vier parallelen Ansätzen.

3.3.5. Wirkung von Lipoprotein und Tripalmitoylpentapeptid auf Makrophagen

Makrophagen kommt bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen und Tumoren eine besondere Rolle zu (86). Dabei gehen die Makrophagen von einem "ruhenden" in einen "aktivierten" Zustand über. Der aktivierte Status von Makrophagen ist schwierig zu umreißen und folglich nicht exakt definiert. Jedoch erfahren die Zellen beim Übergang zum aktivierten Zustand eine Reihe biochemisch er-

fassbarer Veränderungen wie z.B. Erhöhung der Hydrolaseaktivität (87), Bildung von O_2^--Jonen (88, 89), Exkretion von Kollagenase (90) und von Elastase (91, 92) und Veränderung der 5'-Nukleotidase-Aktivität (57).

3.3.5.1. Aktivierung von Makrophagen in vitro

Für die Bestimmung der Makrophagenaktivität nach Stimulation durch Lipoprotein und Tripalmitoylpentapeptid in vitro wurde der 5'-Nucleotidasetest gewählt. 5'-Nucleotidase ist ein weit verbreitetes Enzym, das Monophosphat-5'-Ribonucleotide unter Freisetzung von Phosphat in ihre entsprechenden Nucleoside hydrolysiert. Edelson und Cohn zeigten, daß das membrangebundene Enzym bei aktivierten Makrophagen eine geringere Aktivität zeigt als bei ruhenden Makrophagen (57). Der Versuch wurde wie unter Abschnitt 2.5.1.3 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Tier drei Tage vor der in vitro-Kultivierung der PEC mit 2 ml 3%iger Thioglycollatlösung intraperitoneal immunisiert.

Die spezifische Enzymaktivität nimmt nach einer Stimulation mit Tripalmitoylpentapeptid ab. Die Hydrolysefähigkeit des Membranproteins ist nach Exposition der Zellen mit Lipoprotein stark reduziert und verschwindet völlig bei thioglycollatbehandelten Peritonealmakrophagen.

3.3.5.2. Aktivierung von Makrophagen in vivo

Ein Maß für die Makrophagenaktivierung stellt auch ihre erhöhte Fähigkeit zur Pinozytose (93) und zur Phagozytose (94) dar. Zur Untersuchung der in vivo induzierten Stimulierung von Makrophagen wurde deshalb die

Tabelle 12: 5'-Nucleotidase-Aktivität von in vitro stimulierten Balb/c-Peritonealmakrophagen (PEC)

Mitogen a)	spez. Aktivität der 5'-Nucleotidase [nmol AMP/(min · mg Prot.)]
kein	3,4
Tripalmitoyl-pentapeptid	2,1
Lipoprotein	1,4
Thioglycollat-behandelte PEC	0

a) 10^6 Peritonealzellen wurden mit jeweils 100 µg/ml Mitogen bzw. nur mit MEM für 24 h inkubiert.

Erhöhung der Phagozyteoserate von Blutmonozyten den biochemischen Untersuchungen vorgezogen. Hierzu wurde immunisierten Balb/c-Mäusen nach Ablauf von 72 h 200 µl einer Tuschelösung injiziert und in bestimmten Zeitabständen Blut aus dem retroorbitalen Venusplexus entnommen. Der in der Tusche enthaltene Kohlenstoff wird von aktivierten Zellen schneller aus dem Blut eliminiert als von ruhenden Monozyten (vergleiche Kapitel 2.5.2). Der Phagozytoseindex (K) berechnet sich aus

$$(K) = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_1 - T_2}$$

Dabei bedeutet C_i die Kohlenstoffkonzentration zur Zeit T_i. Tabelle 13 faßt die Ergebnisse aus drei Experimenten zusammen.

Tabelle 13: Phagozytoseindices von in vivo immunisierten Balb/c-Mäusen

Mitogen a)	Phagozytoseindex (K)	Korrelationskoeffizient der Regressionsger.	
kein	0,018 ± 0,004	- 0,906 ± 0,074	b)
E. coli FLP	0,068 ± 0,034	- 0,969 ± 0,028	c)
Tripalmitoylpentapeptid	0,063 ± 0,033	- 0,960 ± 0,023	d)
LPS (Difco)	0,055 ± 0,008	- 0,957 ± 0,031	e)

a) 35 µg wurden drei Tage vor dem Test intravenös injiziert
b) Mittelwerte von 10 Tieren
c) " " 6 "
d) " " 5 "
e) " " 3 "

Tabelle 13 kann klar entnommen werden, daß drei Tage nach der Injektion von Lipoprotein, Lipopolysaccharid und Tripalmitoylpentapeptid eine ca. 4fach höhere Phagozytoseaktivität gegenüber unbehandelten Tieren auftritt. Die synthetische Verbindung weist eine dem nativen Protein entsprechende Induktionsfähigkeit auf.

4. DISKUSSION

4.1. Lipoprotein und seine synthetischen Analoga als Mitogene in vitro

Lipoprotein kommt auf der äußeren Membran von Escherichia coli und anderen Enterobacteriaceen in freier und gebundener Form vor (95). In der vorliegenden Arbeit wurde freies Lipoprotein aus Escherichia coli B/r nach der Methode von Inouye (49) isoliert und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Abbildung 1) näher charakterisiert. Freies Lipoprotein enthält im Gegensatz zu Mureinlipoprotein kein Muramyldipeptid, das selbst mitogene und adjuvante Eigenschaften besitzt. Aus 200 g eingesetztem Bakterienfeuchtgewicht konnten zwischen 24 und 32 mg Lipoprotein isoliert werden.

Freies Lipoprotein zeigt in vitro einen starken proliferationsinduzierenden Effekt auf Milzlymphozyten der Mäuseinzuchtstämme Balb/c und C3H/HeJ (Abbildungen 3 und 4). Mitogene Eigenschaften von Lipoprotein wurden erstmals von Melchers et al. (34) nachgewiesen. Da auch beim Einsatz von Zellen des LPS-nonresponder-Stammes C3H/HeJ eine deutlich erhöhte Proliferationsrate der Lymphozyten in Gegenwart der Lipoproteinpräparationen zu verzeichnen ist, ist gesichert, daß die hier beobachteten Effekte nicht auf Kontamination mit Lipopolysaccharid zurückzuführen sind. LPS zählt zu den am besten untersuchten B-Zell-Mitogenen und wurde deshalb in allen Experimenten als Vergleichssubstanz eingesetzt. Im Lipopolysaccharid ist der Lipid A-Teil des Moleküls für die Mitogenität (36) und Adjuvanseigenschaft (96) verantwortlich. Ihm kommen jedoch noch eine Reihe weiterer Funktionen zu. Hierzu gehören die Aktivierung von Makrophagen (37) und die Induktion einer unspezifischen Resistenz gegen bakterielle Infektionen (38). Für FLP ist gezeigt worden, daß der für die mitogene Aktivität verantwortliche Molekülteil im N-terminalen Bereich liegt

(64) und daß das Vorhandensein von zumindest einer Fettsäure für die Mitogenität des Moleküls notwendig ist (97). Durch enzymatische Behandlung von Lipoprotein können Lipopeptidfragmente gewonnen werden, die aus Glycerylcystein bestehen, an das 3 Fettsäuren und ein 3 bis 5 Aminosäuren umfassendes Oligopeptid gebunden sind. Diese Fragmente zeigten ebenfalls mitogene Aktivität (64). Um die für eine Lymphozytenstimulierung notwendige minimale Struktur zu bestimmen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von G. Jung, Tübingen, synthetische Lipoproteinderivate (Tripalmitoylpentapeptid und Tripalmitoylcystein) dargestellt (vergleiche Abbildung 2) und deren biologische Aktivität untersucht. Im Vergleich zu FLP besitzt Tripalmitoylcystein einen deutlich geringeren, jedoch signifikanten Stimulationseffekt auf Milzzellsuspensionen von Balb/c- und C3H/HeJ-Mäusen, während Tripalmitoylpentapeptid eine dem nativen Protein vergleichbare proliferationsinduzierende Wirkung aufweist (Abbildungen 6 und 7). Mit dem synthetischen Pentapeptid steht somit eine Verbindung zur Verfügung, die genau charakterisiert und frei von Kontaminationen durch Bakterienbestandteile ist. Sie eignet sich damit auch für in vivo-Studien, um die komplexen Regulationsmechanismen nach bakteriellen Infektionen zu untersuchen. Die Fähigkeit des Lipoproteins und seiner synthetischen Analoga, auch Zellen thymusloser Mäuse zu aktivieren (Abbildungen 5 und 8) bzw. ihr Unvermögen, Thymozyten zu vermehrter Proliferation zu induzieren (Abbildungen 9 und 10), weisen in Richtung eines T-Zell-unabhängig verlaufenden Prozesses. Mit letzter Sicherheit ist eine Beteiligung funktioneller T-Zellen am Stimulationsprozess aber nicht auszuschließen, da auch thymuslose Tiere T-Vorläuferzellen besitzen (69, 70), die im Verlaufe einer mitogenen Stimulation ausreifen können. Eine durch Concanavalin A hervorgerufene Erhöhung der DNA-Syntheserate bei niedrigen Mitogenkonzentrationen (Abbildungen 9 und 10) zeigt, daß auch nackte Mäuse über eine geringe Anzahl reaktiver T-Zellen verfügen.

Lymphozyten aus dem peripheren Blut des Menschen scheinen auf einen mitogenen Reiz durch Lipoprotein aus S. thyphimurium (Johnson, persönliche Mitteilung) oder E. coli (76) nur mit einer geringfügigen Erhöhung der Lymphozytenteilungsrate zu antworten, während solche aus der Peripherie von Balb/c-Mäusen mit einer deutlich erhöhten DNA-Synthese reagieren (Abbildung 12). Eine ähnliche restriktive Beschränkung der Immunantworten mitogen induzierter Lymphozyten für bestimmte Spezies wurde bereits von Bona beschrieben (98). Eine Erklärung dieses Variationsspektrums und seine potentielle Bedeutung konnte bislang noch nicht gefunden werden.

4.2. Lipoprotein und seine synthetischen Analoga als Mitogene in vivo

Einige in der Literatur beschriebene Untersuchungen zur Immunantwort bei Mäusen in vivo zeigten, daß nach der Injektion von LPS eine Vergrößerung der Milz und eine Proliferation der Milzlymphozyten induziert werden (37, 77). Die intravenöse Gabe von E. coli Lipoprotein und seiner synthetischen Analoga verursachte bei Mäusen entsprechende Effekte, da am dritten Tag nach der Immunisierung annähernd eine Verdoppelung der Milzgewichte (vergleiche Tabelle 3) zu verzeichnen war. Diese makroskopisch gut sichtbaren Veränderungen der Organe wurden von einer Zunahme kernhaltiger Zellen begleitet (Tabellen 1 und 2) und sind wahrscheinlich auf eine Erhöhung der Zellteilungsrate in den Milzen oder auf eine Einwanderung peripherer Leukozyten zurückzuführen.

Escherichia coli-Lipoprotein, Tripalmitoylcystein und Tripalmitoylpentapeptid können B-Lymphozyten von Balb/c-Mäusen in vivo zur polyklonalen Antikörpersynthese induzieren wie aus dem vermehrten Auftreten plaquebildender Zellen gegen trinitrophenolbeschichtete und unbehandelte Schafserythrozyten zu entnehmen ist (Tabelle 3). Tripalmitoylpentapeptid weist eine dem nativen Lipoprotein

vergleichbare Aktivierungskapazität auf, während Tripalmitoylcystein eine geringe, aber deutliche Stimulation bewirkt. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem sensitiveren Protein A-Plaquetest erzielt, der alle antikörperproduzierenden Zellen zu erfassen imstande ist (55). Da wir in unseren Experimenten ein von R. B. Johnson hergestelltes Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulinserum als Entwicklungssystem verwendeten, konnten wir in den Protein A-Tests alle Antikörperklassen erfassen.

Melchers konnte in einem in vitro-System mit Hilfe des Protein A-Plaquetests nachweisen, daß IgG-sekretierende Klone erst am fünften Tag nach der Inkubation der Lymphozyten mit LPS bzw. Lipoprotein auftraten (99). Dieses Ergebnis deckt sich im wesentlichen mit unseren Beobachtungen, daß am dritten Tag keine Differenz zwischen IgM-sekretierenden Plasmazellen und der Gesamtzahl plaquebildender Zellen zu beobachten ist (unveröffentlichte Ergebnisse). Während die Arbeitsgruppe um Melchers jedoch eine Frequenz reaktiver B-Zellen von eins in drei für LPS, bzw. von eins in vier für Lipoprotein in ihrem in vitro-System nachweisen konnte, traten bei in vivo-Injektion der Mitogene in Balb/c-Mäuse nur Frequenzen von einer reaktiven Milzzelle auf 30 - 40 Milzzellen für LPS, bzw. einer Zelle auf 80 - 150 Milzzellen für Lipoprotein und Tripalmitoylpentapeptid auf. Gründe für diese Diskrepanz könnten die unterschiedlichen Systeme oder die Verwendung verschiedener Mäusestämme sein. Auch Milzzellen des Stamms C3H/HeJ antworten auf Lipoprotein und den synthetischen Anloga mit polyklonaler Immunglobulinsekretion (Tabelle 4). Zellen dieses Mäuseinzuchtstamms können aufgrund eines genetischen Defekts nicht auf LPS antworten (66, 67). In unserem Experiment stimulierte jedoch ein nach Westphal (100) isoliertes Lipopolysaccharid noch bis zur 10fach höheren Immunglobulinsynthese gegenüber Zellen unbehandelter Tiere, was möglicherweise durch geringste Spuren verunreinigender Proteine verursacht wurde. Mohri et. al. (101) z.B. beobachteten ebenfalls eine mitogene Stimula-

tion von LPS auf C3H/HeJ-Zellen. In Verbindung mit den in vitro-Experimenten zur Stimulation von LPS-nonresponder Lymphozyten nach Inkubation mit Lipoprotein kann jedoch mit größter Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die polyklonale Aktivierung der Milzzellen auf eine Lipopolysaccharidkontamination zurückzuführen ist, zumal auch das synthetische und damit eindeutig charakterisierte und LPS-freie Tripalmitoylpentapeptid die gleichen Effekte wie natives Lipoprotein auf Lymphozyten verschiedener Inzuchtstämme aufweist.

Milzzellen thymusloser Mäuse, die nur wenige reife T-Zellen haben, wurden ebenfalls nach Injektion von Lipoprotein bzw. TPP zur Immunglobulinsynthese angeregt (Tabellen 6a und 6b). Diese Befunde liefern Anhaltspunkte dafür, daß beide Substanzen B-Zell-Mitogene in vivo darstellen, deren polyklonale Aktivität nicht von der Anwesenheit funktioneller T-Lymphozyten abhängig ist. Die mitogene Aktivierung von B-Lymphozyten verschiedener Spezies durch bakterielle Oberflächenkomponenten scheint ein allgemeingültiges Merkmal zu sein.

In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, daß ebenso wie LPS, das zu den bestuntersuchten polyklonalen B-Zell-Aktivatoren gehört, auch Lipoprotein aus Escherichia coli und zwei synthetisch dargestellte Verbindungen, die dem N-terminalen Teil des Proteins entsprechen, in vivo polyklonale B-Zell-Aktivatoren sind. Ferner gehören auch Zelloberflächenbestandteile gram-positiver Bakterien in die Reihe polyklonaler B-Zell-Aktivatoren (102). Alle diese Verbindungen üben einen unspezifischen Reiz auf Lymphozyten aus, der zur Proliferation mit anschließender Ausdifferenzierung zur Plasmazelle führt.

4.3. Kinetik der Stimulation in vivo

Die polyklonale Immunantwort nach einer einmaligen Injektion von Lipoprotein bzw. TPP, gemessen gegen TNP-beschichtete und unbehandelte Erythrozyten (Abbildun-

gen 19 und 21), entwickelt sich sehr rasch und erreicht ein deutliches Optimum bereits drei Tage nach der Immunisierung der Tiere. Die Immunglobulinsynthese reduziert sich dann rasch wieder auf die geringe Antikörperproduktion unbehandelter Mäuse. Parallel zu diesem Verlauf der B-Zell-Antwort vollzieht sich die Veränderung der Milzgrößen und damit der Zellzahl der Organe. Diese Aussage trifft vor allem auf eine Immunisierung mit nativem Lipoprotein zu (vergleiche Kapitel 3.3.3.1).

Unterzieht man Balb/c-Mäuse jedoch einer einmaligen Immunisierung mit dem synthetischen TPP, so erreicht auch hier die gegen TNP-SRBC, SRBC und Protein A-SRBC gemessene Antikörpersynthese 72 h nach der Immunisierung ein Maximum und nimmt dann wieder ab. Danach steigt die Immunantwort erneut an und erreicht ein zweites Maximum ca. 7 Tage nach Injektion (vergl. Abschnitt 3.3.3.2). Ein ganz ähnliches cyclisches Muster der Immunantwort wird nach Immunisierung einer Maus mit einer immunogenen Dosis von bakteriellem LPS erhalten (103). Dieses oszillierende Verhalten ist mit regulatorischen Mechanismen, die die Initiation, Amplifikation und Suppression der Immunantwort steuern, korreliert. Möglicherweise werden Plasmazellen periodisch durch persistierendes Antigen stimuliert, um erneut durch spezifische Antikörper blokkiert zu werden (103). Romball und Weigle postulierten eine synchrone Differenzierung von B-Zellen unter der Kontrolle lokal produzierter spezifischer Antikörper (104). Weiter wird die Beteiligung von idiotypischen Antikörpern (105) und Suppressor-T-Zellen (106, 21) in Betracht gezogen. Das Auftreten der cyclischen Antikörpersynthese hängt sowohl von der verabreichten Dosis wie auch vom verwendeten Mäusestamm ab (107). Deshalb könnte der Grund für das Ausbleiben der cyclischen Antwort auf Lipoproteininjektion die im Vergleich zum synthetischen Mitogen geringere eingesetzte Anzahl von Molekülen sein. Jedem Tier wurden 35 µg Mitogen intravenös gespritzt. Lipoprotein hat ein Molekulargewicht von 7200 Dalton (34), im Gegensatz zu 1270 Dalton von TPP. Ob spezifi-

sche Antikörper in diesem Fall an der Regulation beteiligt sind, bleibt fraglich, da es nicht gelang, im Immunhämolysetest spezifische Immunglobuline gegen Lipoprotein bzw. TPP nachzuweisen (unveröffentlichte Ergebnisse). Die Untersuchungen zur polyklonalen Immunantwort nach Lipoproteinapplikation in vivo in Abhängigkeit der verabreichten Mitogenmengen ergeben ein der oszillierenden LPS-Antwort verwandtes Verhalten. Während die ablaufenden immunologischen Prozesse durch eine kontinuierliche Vergrößerung der Milzen deutlich werden und damit eine Erhöhung der absoluten Lymphozytenzahl der Organe korreliert ist (Tabelle 1), folgt die polyklonale Antikörperantwort diesem Trend jedoch nicht, vielmehr treten mehrere distinkte Maxima erhöhter Immunglobulinsynthese auf (Abbildung 14). Johnson konnte nachweisen, daß dies auch für Lipoprotein aus Salmonella thyphimurium gilt. Peavy beobachtete ebenfalls ein Ansteigen der Zellzahlen in den lymphatischen Organen nach Applikation steigender LPS-Mengen (77). Ob die starke, gegen TNP-beschichtete Schafserythrozyten gerichtete Immunglobulinsynthese der höchsten injizierten Mitogenmengen durch eine LPS-Kontamination hervorgerufen wird, sollte noch näher untersucht werden. Auch die Antwort gegen TPP als polyklonales Stimulans ist durch ein nichtlineares Verhalten der Antikörperproduktion gekennzeichnet (Abbildung 17). Die raschen, schon am dritten Tag nach polyklonaler Immunisierung auftretenden Immunreaktionen scheinen einem komplexen Regulationsmechanismus zu unterliegen.

4.4. Regulation der in vivo-Antwort auf bakterielle Mitogene

Polyklonale B-Zell-Aktivatoren stimulieren vorwiegend kleine, ruhende B-Lymphozyten (108). Verschiedene Mitogene müssen nicht notwendigerweise Differenzierungsvorgänge in gleichen B-Zell-Populationen induzieren. Ihre

Fähigkeit, unter mehreren polyklonalen B-Zell-Aktivatoren zu unterscheiden, ist genetisch kontrolliert und spiegelt ihren Differenzierungsstatus wider (109). Verschiedene B-Zell-Populationen können möglicherweise durch das gleiche Mitogen, jedoch abhängig von der dargebotenen Lipoproteinmenge, zur Antikörpersynthese induziert werden, so daß sich die Immunantworten verschiedener abgegrenzter Lymphozytengruppen überlagern würden.

Serum nicht immunisierter Mäuse ist in der Lage eine polyklonale Antikörpersynthese zu modulieren (110, 111). In unserem Labor konnte von Johnson gezeigt werden, daß darüberhinaus Serum immunisierter Tiere in vitro einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf Kulturen ausübt als Serum naiver Mäuse (persönliche Mitteilung). In vivo wirkt Immunserum auch auf die cyclische LPS-Antwort suppressiv (107). Es ist durchaus denkbar, daß neben unspezifischen Faktoren auch immunologisch relevante Zellen an den Regulationsereignissen bei in vivo ablaufenden polyklonalen Immunantworten beteiligt sind. Citron und Michael identifizierten in einem LPS-in vitro-System Makrophagen als die suppressiv wirkenden Zellen, die eine polyklonale Immunantwort mit einem Peak am vierten Tag regulieren (112), während eine andere Arbeitsgruppe B-Lymphozyten als aktive Suppressoren identifizierte (23). Die Modulation unspezifischer B-Zell-Aktivatoren durch T-Zellen ist bislang noch unklar, doch scheinen sie eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen. So postulierten z.B. Weigle und Romball eine Beteiligung von T-Suppressorzellen an der oszillierenden Immunantwort (83, 84). Ein klares Konzept, wie polyklonale B-Zell-Aktivatoren auf zellulärer Ebene reguliert werden, konnte bis heute noch nicht erarbeitet werden. Es bleibt auch die Frage nach der Ursache der oben beschriebenen Kurvenverläufe nach dosis- und zeitabhängiger Immunisierung mit den beschriebenen Mitogenen offen.

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob tatsächlich ein aktiver Suppressionsmechanismus an der beobachteten Reduktion polyklonaler Immunglobulinsynthesen nach 72stün-

diger Immunisierung in vivo bzw. bei bestimmten Mitogenkonzentrationen involviert ist, wurden Zellen immunisierter Tiere in vitro restimuliert. Es konnte ein marginaler, jedoch signifikanter Rückgang im Einbau von ^{3}H-Thymidin bei einer Restimulation in vitro mit verschiedenen Mitogenen verzeichnet werden (Kapitel 3.3.4.1). Diese Verringerung der Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten nach vorheriger Stimulation in vivo erstreckt sich sowohl auf ein homologes (FLP in vivo / FLP in vitro) wie auch auf ein heterologes System (FLP in vivo / LPS in vitro) und sogar auf das T-Zell-Mitogen Concanavalin A. Am deutlichsten tritt eine verminderte Proliferation bei der sekundären Inkubation mit LPS zutage (Abbildung 23). Durch die Abtrennung von Blastzellen über einen FCS-Gradienten (113, 114) konnten Populationen kleiner ruhender B-Zellen gewonnen werden. Auch hierbei wurde bei einer Restimulation in vitro das gleiche Phänomen eines etwas verminderten Einbaus von Thymidin beobachtet (unveröffentlichte Ergebnisse). Die Abbildungen 25 und 26 zeigen, daß die leichte Reduktion der Lymphozytenreaktionsfähigkeit höchstwahrscheinlich nicht von der Anwesenheit funktioneller T-Lymphozyten abhängt. Auch nackte Mäuse verlieren einen Teil der Proliferationsleistung ihrer Milzzellen nach vorheriger Stimulation in vivo. Eine Ausnahme bildet jedoch Concanavalin A als sekundäres Mitogen. Hier tritt kein Unterschied zwischen immunisierten und unbehandelten Mäusen auf.

Die von Citron und Michael (112) beobachtete 90%ige Reduktion der Blastogenese und Antikörpersynthese nach vorheriger Immunisierung mit LPS konnte nicht bestätigt werden, obwohl auch in unserem in vivo-System eine Aktivierung von Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.3.5.1). Citron und Michael postulierten, daß nach Immunisierung mit LPS eine Aktivierung von adhärenten Zellen stattfindet, die eine Immunantwort gegen LPS vollständig supprimieren (112). Auch nach Immunisierung mit LPS in vivo wird in unserem System nach

einer sekundären Mitogenexposition der Lymphozyten nur ein sehr geringer Reduktionseffekt beobachtet (Kapitel 3.3.5.2). Zelltrennungsexperimente ergaben keinen näheren Anhaltspunkt auf die hierfür verantwortliche Zellpopulation. Angereicherte B-Lymphozyten antworten nahezu identisch wie eine Gesamtmilzzellpopulation auf einen sekundären mitogenen Reiz. Das gilt sowohl für geprimte wie für naive Lymphozyten (Abbildungen 27 und 28). In Populationen, bei denen durch eine anti-Immunglobulinserumbehandlung und Komplement B-Zellen eliminiert werden, wird nur noch eine geringe Proliferation nach sekundärer Mitogenexposition verzeichnet. Obwohl die Effizienz der Zelltrennung in einem Immunfluoreszenztest überprüft wurde, und die B-Zell-Population frei von Theta-Antigen-tragenden Zellen war (vergleiche Kapitel 2.6.2), konnte gezeigt werden, daß Lymphozyten nach einer Elimination von T-Zellen auf Concanavalin A noch mit einer geringen Proliferation antworten können (Abbildungen 29 und 30). In ergänzenden Experimenten wurde nachgewiesen, daß die geringe Anzahl der in B-Lymphozytenpopulationen verbliebenen T-Lymphozyten so stark proliferiert, daß bereits nach 48 h die Stimulation dieser Zellen nicht mehr von einer normalen Milzzellpopulation unterschieden werden kann (unveröffentlichte Ergebnisse).

Ein Frühstadium LPS-stimulierter Lymphozyten entwikkelt sich nach Melchers und Andersson (115) unabhängig von einer DNA-Synthese, während die Bildung reifer Plasmazellen abhängig von der DNA-Synthese ist. Proliferation und Antikörpersynthese müssen nicht notwendigerweise demselben modulierenden Mechanismus unterliegen (116), regulatorische Zellen einer polyklonalen Immunreaktion könnten folglich auf zwei Ebenen wirken. Da die in vitro-Versuche zur sekundären Mitogenexposition nur eine proliferationsinduzierende Wirkung der Verbindungen zum Gegenstand ihrer Untersuchungen hatten, wurden Reimmunisierungen von Mäusen durchgeführt, um ihre Auswirkung auf die Immunglobulinsynthese in vivo zu bestimmen.

Durch eine zweimalige Injektion von Lipoprotein läßt sich keine Erhöhung der polyklonalen Antikörpersynthese erzielen (Tabelle 10). Da 30% aller Milzlymphozyten durch Lipoprotein stimulierbar sein müßten (30), dürfte das Potential reaktiver Zellen nach Erstimmunisierung noch nicht vollständig erschöpft sein. Mit dem synthetischen Analogon Tripalmitoylpentapeptid kann ebenfalls keine Steigerung der Antikörpersynthese in vivo nach zweimaliger bzw. viermaliger Injektion erreicht werden (Tabelle 11).

Die Experimente zur sekundären Stimulation in vitro und in vivo lassen keine exakten Aussagen zu, ob suppressiv wirkende Zellen an der Regulation polyklonaler Immunantworten beteiligt sind. Geprimte Zellen besitzen nach einer Reexposition mit Mitogenen weiterhin die Fähigkeit zu proliferieren bzw. Antikörper zu synthetisieren. Ein synergistischer Effekt kann jedoch nicht erzielt werden. Die Stärke der Immunantworten ist im ganzen leicht reduziert.

4.5. Aktivierung von Makrophagen durch Lipoprotein und seine synthetischen Analoga

Makrophagen und Monozyten spielen eine zentrale Rolle im Verlauf einer bakteriellen Infektion. Lipopolysaccharid vermag Makrophagen in einen zytotoxischen Zustand zu versetzen (117, 118), wie dies auch durch eine Infektion mit ganzen Bakterien geschieht (119). Bei Infektion mit bestimmten Mikroorganismen können aber auch suppressiv wirkende Makrophagen auftreten (22).

Aktivierte Makrophagen zeigen eine Reihe biochemisch meßbarer Veränderungen (87, 88, 89, 90, 91). Ruhende adhärente Zellen z.B. weisen gegenüber stimulierten Zellen eine höhere Aktivität der membrangebundenen 5´Nucleotidase auf. Dieses Enzym hydrolysiert Monophosphat 5´-Ribonucleotide in ihre entsprechenden Nucleoside unter Freisetzung von anorganischem Phosphat (57). Die spezi-

fische 5'Nucleotidaseaktivität nichtstimulierter Mäuseperitonealzellen liegt bei Balb/c-Mäusen in unserem System bei 3 - 4 nmol AMP/(min · mg Protein). Dieser Wert ist niedriger als der von Edelson (57) beschriebene. Da jedoch die Gegenwart von foetalem Kälberserum bei der in vitro-Kultivierung Einfluß auf die Enzymaktivität hat, kann einer der Gründe für die geringe Hydrolysefähigkeit in unseren Experimenten die geringe FCS-Konzentration im Ansatz sein. Auch wurde das Serum vor Gebrauch hitzeinaktiviert, was nach Edelson ebenfalls eine niedrigere Enzymaktivität zur Folge hat (57). Mit zunehmendem Aktivierungsgrad der Makrophagen nimmt die 5'Nucleotidaseaktivität ab. Durch Inkubation der Zellen mit Lipoprotein und Tripalmitoylpentapeptid geht die Hydrolaseaktivität des Membranproteins allmählich wieder verloren, was ein Hinweis auf die Stimulierung der Peritonealzellen ist (Tabelle 12). Thioglycollataktivierte Zellen zeigen wie in der Literatur beschrieben (57) keinerlei Aktivität mehr. Von anderer Seite konnte bestätigt werden, daß Lipoprotein in der Lage ist, Makrophagen in einen aktivierten Zustand zu versetzen. Die Arbeitsgruppe um Rietschel, Borstel, konnte eine Erhöhung der Prostaglandinsynthese nach Inkubation mit Lipoprotein nachweisen (persönliche Mitteilung an W. Bessler). Die Produktion dieser die Immunantwort modulierenden Verbindung ist in vivo mit einer Erhöhung der unspezifischen antibakteriellen Aktivität der Makrophagen korreliert (120).

Aktivierte Makrophagen sind auch durch eine höhere Pinocytose- und Phagocytoserate (93, 94) gekennzeichnet. Als Modell für die in vivo-Aktivierung von Makrophagen wurde die Eliminierung von Kohlenstoffpartikeln aus dem Blut immunisierter Tiere bestimmt. Je höher der Aktivierungszustand der Monozyten ist, umso rascher verschwindet Kohlenstoff aus dem peripheren Blut. Tabelle 13 zeigt, daß auch in vivo eine erhöhte Monozytenaktivität bestimmt werden kann. Nach Injektion von Lipoprotein und Lipopoysaccharid erhöht sich der ermittelte Phagozyto-

seindex der Zellen auf das 4fache gegenüber unstimulierten Tieren. Auch Lipopolysaccharid hat stimulierende Wirkung auf die Phagozytoseleistung der Mäusemonozyten. Damit konnte für Lipoprotein, und in vergleichbarem Maße auch für Tripalmitoylpentapeptid, eine Aktivierung der Makrophagen in vitro und in vivo nachgewiesen werden. Inwieweit diese Stimulierung für die Regulation polyklonaler Immunantworten von Bedeutung ist, bleibt allerdings unklar.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Lipoprotein und zwei synthetische Analoga, Tripalmitoylpentapeptid und Tripalmitoylcystein, die dem N-terminalen Bereich von Lipoprotein entsprechen, wurden auf ihre biologische Aktivität in verschiedenen in vitro- und in vivo-Systemen untersucht.

In vitro konnte die mitogene Wirkung der drei Substanzen gegenüber Milzlymphozyten verschiedener Mäuseinzuchtstämme nachgewiesen werden. Ebenso wurden Zellen von Lymphknoten und Lymphozyten des peripheren Bluts zur Teilung induziert. Thymozyten zeigten keine erhöhte DNA-Syntheserate nach Inkubation mit diesen Mitogenen.

In vivo induzierten Lipoprotein aus E. coli und die synthetischen Verbindungen eine Erhöhung der Antikörpersynthese, deren polyklonale Natur im Plaquetest gegen TNP-beschichtete Schafserythrozyten nachgewiesen werden konnte. Die polyklonale Antikörpersynthese war kurzlebig mit einer maximalen Immunglobulinproduktion am dritten Tag nach der Immunisierung. Parallel zu der vermehrten Produktion polyklonaler Antikörper wurde eine Vergrößerung der lymphatischen Organe, sowie eine größere Anzahl kernhaltiger Zellen in den entsprechenden Organen beobachtet. Diese Zellen lassen sich in vitro durch einen weiteren Mitogenkontakt erneut zur Proliferation stimulieren. Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der mitogenen Immunreaktion in vivo verdeutlichten ihren komplexen Verlauf. Es traten mehrere Stimulationsmaxima im Bereich von 35 - 350 µg Mitogen/Maus auf. Mehrmalige in vivo-Immunisierung der Tiere resultierte nicht in einer Steigerung der Antikörperproduktion durch Milzlymphozyten.

Eine Aktivierung von Makrophagen und Monozyten nach dem Kontakt mit Lipoprotein und Tripalmitoylpentapeptid konnte sowohl im in vivo- wie auch im in vitro-System gezeigt werden.

Insgesamt erwies sich Lipoprotein aus Escherichia coli als ein starkes Mitogen. Tripalmitoylpentapeptid zeigte vergleichbare Stimulationseffekte, während Tripalmitoylcystein eine geringere, aber signifikante, Aktivierung von Lymphozyten hervorrufen konnte.

6. LITERATUR

1. Hood, L.E., Weissmann, I.L. and Wood, W.B.:
   Immunology.
   The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.,
   Menlo Park, California (1978).

2. Keller, R.:
   Immunologie und Immunpathologie.
   G. Thieme Verlag, Stuttgart, (1977).

3. Steinman, R.M. and Cohn, Z.A.:
   Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro.
   J. Exp. Med., 139, (1974), 380-397.

4. Hahn, H. und Opferkuch, W.:
   Mechanismen der immunologischen Infektabwehr.
   Praxis der Immunologie, K.O. Thieme, Stuttgart, (1976).

5. Lohmann-Matthes, M.L.:
   Der Makrophage.
   BIUZ, Verlag Chemie, Weinheim, (1981).

6. Bessler, W.G.:
   Abwehrmechanismen gegen bakterielle Infektionen.
   BIUZ, Verlag Chemie, Weinheim, (1981).

7. Jerne, N.K.:
   The somatic generation of immune recognition.
   Eur. J. Immunol., 1, (1971), 1-9.

8. Tonegawa, S.:
   Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: Further evidence for somatic generation.
   Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, (1976), 203-207.

9. Hozumi, H. and Tonegawa, S.:
   Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.
   Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, (1976), 3628-3632.

10. Early, P. and Hood, L.:
    Allelic exclusion and nonproductive immunoglobulin gene rearrangement.
    Cell, 24, (1981), 1-3.

11. Binz, H. and Wigzell, H.:
Antigen-binding idiotypic receptors from T-lymphocytes: An analysis of their biochemistry, genetics and use as immunogens to produce specific immune tolerance.
Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 41, (1976), 275-284.

12. Binz, H. and Wigzell, H.:
Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinantes. I. Demonstration of similar or identical idiotypes on IgG molecules and T-cell receptors with specificity for the same alloantigens.
J. Exp. Med., 142, (1975), 197-211.

13. Sondel, P.M., Chess, L., Mac Dermott, R.P., and Schlossman, S.F.:
Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. III. Specific allogenic lympholysis mediated by human T cell alone.
J. Immunol., 114, (1975), 982-987.

14. Cohen, S., Pick, E. and Oppenheim, J.J.:
Biology of the lymphokines.
Academic Press, New York, (1979).

15. Rocklin, R.E., Bendtzen, K. and Greineder, D.:
Mediators of immunity: lymphokines and monokines.
Adv. Immunol., 29, (1980), 55-136.

16. Reinherz, E.L. and Schlossman, S.F.:
The differentation and function of human T lymphocytes.
Cell, 19, (1980), 821-827.

17. Persson, U., Hammarström, L., Möller, E., Möller, G. and Smith, C.I.E.:
The role of adherent cells in B and T lymphocyte activation.
Immunol. Rev., 40, (1978), 78-101.

18. Erb, P., Stern, A.C., Alkan, S.S., Studer, S., Zoumbou, E. and Gisler, R.H.:
Characterization of accessory cells required for helper T cell induction *in vitro*: evidence for a phagocytic, Fc-receptor and Ia-bearing celltype.
J. Immunol., 125, (1980), 2504-2507.

19. Waldman, H. and Munro, A.:
T-cell dependent mediator in the immune response.
Nature, London, 234, (1973), 356-357.

20. Armerding, D. and Katz, D.H.:
Activation of T and B lymphocytes *in vitro*.
J. Exp. Med., 140, (1974), 19-37.

21. Baker, P.J.:
Homeostatic control of antibody responses: A model based on the recognition of cell-associated antibody by regulatory T cells.
Transplant. Rev., 26, (1975), 3-20.

22. Youdim, S.:
Enhancing and suppressive effects of macrophages on T-lymphocyte stimulation in vitro.
Cell. Immunol., 45, (1979), 377-388.

23. Koenig, S. and Hoffmann, M.K.:
Bacterial lipopolysaccharide activates suppressor B-lymphocytes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, (1979), 4608-4612.

24. Jerne, N.K.:
Towards a network theory of the immune system.
Ann. Immunol., 125, (1974), 375-389.

25. Bernabe, R.R., Coutinho, A., Martinez, A.C. and Cazenave, P.:
Immune networks.
Frequencies of antibody and idiotype-producing B cell clones in various steady states.
J. Exp. Med., 154, (1981), 552-556.

26. Kim, B.S. and Greenberg, J.A.:
Mechanisms of idiotype suppression.
IV. Functional neutralization in mixtures of idiotype-specific suppressor and hapten-specific suppressor T cells.
J. Exp. Med., 154, (1981), 809-820.

27. Potash, M.J.:
B-lymphocyte stimulation.
Cell, 23, (1981), 7-8.

28. Coutinho, A. and Möller, G.:
Immune activation of B cells: Evidence for one non-specific triggering signal not delivered by the Ig receptors.
Scand. J. Immunol., 3, (1974), 133-141.

29. Bretscher, P. and Cohn, M.:
A theory of self-nonself discrimination.
Science, 169, (1970), 1042-1049.

30. Andersson, J., Coutinho, A., Lernhardt, W. and Melchers, F.:
Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion in vitro of every growth inducible B lymphocyte.
Cell, 10, (1977), 27-34.

31. Di Rienzo, J.M., Nakarumura, K. and Inouye, M.:
The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions.
Ann. Rev. Biochem., 47, (1978), 481-532.

32. Osborn, M.J. and Wu, C.P.:
Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria.
Ann. Rev. Microbiol., 34, (1980), 369-422.

33. Bessler, W.G. and Hennig, U.:
Protein I and Protein II* from the outer membrane of Escherichia coli are mouse B lymphocyte mitogens.
Z. Immun. Forsch., 155, (1979), 387-398.

34. Melchers, F., Braun, V. and Galanos, C.J.:
The lipoprotein of the outer membrane of Escherichia coli: A B lymphocyte mitogen.
J. Exp. Med., 142, (1975), 473-483.

35. Kamino, Y. and Nikaido, H.:
Outer membrane of Salmonella thyphimurium. Identification of proteins exposed on cell surface.
Biochem. Biophys. Acta, 464, (1977), 589-601.

36. Andersson, J., Sjöberg, O. and Möller, G.:
Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides.
Eur. J. Immunol., 2, (1972), 349-353.

37. Doe, W.F., Yang, S.T., Morrison, D.C., Betz, S.J. and Henson, P.M.:
Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. II. Evidence for differentiation signals delivered by lipid A and by a protein rich fraction of lipopolysaccharide.
J. Exp. Med., 148, (1978), 557-568.

38. Chedid, L.M., Parant, M., Damais, C., Parant, F., Juy, D. and Galelli, A.:
Failure of endotoxin to increase nonspecific resistance to interferon of lipopolysaccharide low responder mice.
Infect. Immun., 13, (1976), 722-727.

39. Andersson, J., Möller, G. and Sjöberg, O.:
Selective induction of DNA synthesis in T and B lymphocytes.
Cell. Immunol. 4, (1972), 381-393.

40. Nilsson, B.S., Sultzer, B.M. and Bullock, W.W.:
Purified protein derivative of tuberculin induces immunoglobulin production in normal mouse spleen cells.
J. Exp. Med., 137, (1973), 127-139.

41. Möller, G. and Landwall, P.:
The polyclonal B-cell activating property with protein A is not due to its interaction with the F_c part of immunoglobulin receptors.
Sand. J. Immunol, 6, (1977), 357-366.

42. Coutinho, A. and Möller, G.Z.:
B cell mitogenic properties of thymus independent antigens.
Nature, London, 245, (1973), 12-14.

43. Primi, D., Hammarström, L., Smith, C.I.E. and Möller, G.:
Polyclonal B cell activators induce immunological response to autologous serum proteins.
Cell. Immunol., 34, (1977), 367-375.

44. Primi, D., Hammarström, L., Smith, C.I.E. and Möller, G.:
Characterization of self-reactive B cells by polyclonal B cell activators.
J. Exp. Med., 145, (1977), 21-30.

45. Primi, D., Hammarström, L., Smith, C.I.E. and Möller, G.:
Immunological unresponsiveness of self-recognizing B lymphocytes to the PBA property of a soluble T cell factor.
Cell. Immunol., 41, (1978), 320-329.

46. Ringden, O., Rynnel-Dagöö, B., Kunori, T., Smith, C.I.E., Hammarström, L., Freijd, A. and Möller, E.:
Induction of antibody synthesis in human B lymphocytes by different polyclonal B cell activators: Elevation by direct and indirect PFC assays.
Immunol. Rev., 45, (1979), 195-218.

47. Hannestad, K.:
Certain rheumatoid factors react with both IgG and an antigen associated with cell nuclei.
Scand. J. Immunol., 7, (1978), 127-136.

48. Izui, S., Eisenberg, A. and Dixon, F.:
IgM rheumatoid factors in mice injected with bacterial lipopolysaccharides.
J. Immunol., 122, (1979), 2096-2102.

49. Inouye, S., Takeishi, K., Lee, N., Demartini, M., Hirashima, A. and Inouye, M.:
Lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli: Purification, paracrystallization and some properties of its free form.
J. Bacteriol., 127, (1976), 555-563.

50. BIO-RAD Protein Assay. Instruction manual.
Bio-Rad Laboratories, GmbH, München, (1976).

51. Bradford, M.M.:
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Ann. Biochem., 72, (1976), 248-254.

52. de St. Groth, S.F., Webster, R.G. and Datyner, A.:
Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips.
Biochem. Biophys. Acta, 71, (1963), 377-391.

53. Weber, K. and Osborn, M.:
The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis.
J. Biol. Chem., 244, (1969), 4406-4412.

54. Rittenberg, M.B. and Pratt, K.L.:
Antinitrophenyl (TNP) plaque assay. Primary response of Balb/c mice to soluble and particulate immunogen.
Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 132, (1969), 575-581.

55. Gronowicz, E., Coutinho, A. and Melchers, F.:
A plaque assay for cells secreting Ig of a given type or class.
Eur. J. Immunol., 6, (1976), 588-590.

56. Goding, J.W.:
The chromic chloride method of coupling antigens to erythrocytes: Definition of some important parameters.
J. Immunol. Meth., 10, (1976), 61-66.

57. Edelson, P.J. and Cohn, Z.A.:
5´Nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages. I. Synthesis and degradation in resident and inflammatory populations.
J. Exp. Med., 144, (1979), 1581-1595.

58. van der Zeijst, B., Stewart, C.C. and Schlesinger, S.:
Proliferative capacity of mouse peritoneal macrophages in vitro.
J. Exp. Med., 147, (1978), 1253-1266.

59. Amante, L.A., Ancona, A. and Forni, L.:
Conjugation of immunoglobulins with tetramethylrhodamine isothiocyanate. A comparison between the amorphous and the crystalline fluorochrome.
J. Immunol. Meth., 1, (1972), 289-301.

60. Goding, J.W.:
Conjugation of antibodies with fluorochromes. Modification to the standard methods.
J. Immunol. Meth., 13, (1976), 215-226.

61. Goldman, M.:
Labeling agents and procedures of conjugations.
In: M. Goldman, Fluorescence antibody methods.
Academic Press, New York, (1968).

62. Andersson, J., Coutinho, A. and Melchers, F.:
Stimulation of murine B lymphocytes to IgG synthesis and secretion by the mitogens lipopolysaccharide and lipoprotein and its inhibition by anti-immunogobulin antibodies.
Eur. J. Immunol., 8, (1978), 336-343

63. Braun, V.:
Covalent lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Acta, 415, (1975), 335-377.

64. Bessler, W.G., Resch, K., Hancock, E. and Hantke, K.:
Induction of lymphocyte proliferation and membrane changes by lipoprotein derivatives of the lipoprotein from the outer membrane of E. coli.
Z. Immun. Forsch., 153, (1977), 11-22.

65. Bessler, W.G., Wiesmüller, K.-H., Scheuer, W., Johnson, R.B., Fouad, H.H. and Jung. G.:
Synthetic peptide derivatives of bacterial lipoprotein and their interaction with lymphocyte plasma membranes.
In: Proceedings of the 4th Symposium on Chemistry of Peptide and Proteins. In press, (1982).

66. Sultzer, B.:
Genetic control of leucocyte responses to endotoxin.
Nature, 219, (1968), 1253-1254.

67. Watson, J., Largen, M. and Mc Adam, K.P.W.J.:
Genetic control of endotoxic responses in mice.
J. Exp. Med., 147, (1978), 39-49.

68. Pantelouris, E.M.:
Absence of thymus in a mouse mutant.
Nature, 217, (1968), 370-371.

69. Raff, M.C.:
Θ -bearing lymphocytes in nude mice.
Nature, 216, (1973), 350-351.

70. Wortis, H.H., Nehlsen, S. and Owen, J.J.:
Abnormal development of the thymus in "nude" mice.
J. Exp. Med., 134, (1971), 681-692.

71. Raff, M.C.:
In: Surface antigens on nucleated cells.
Transplant. Rev., 6. (1971), 52-80.

72. Bach, J.F.:
B and T lymphocytes.
Iummunology, J. Wiley and Sons, New York.
(1978), 57-91.

73. Eisen, S.A., Lyle, L.R. and Parker, C.H.:
Antigen stimulation of 3H-Thymidine incorporation by subpopulations of human peripheral blood cells.
J Immunol., 111, (1973), 962-972.

74. Greaves, M., Janossy, G. and Doenhoff, M.:
Selective tiggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens.
J. Exp. Med., 140, (1974), 1-18.

75. Peavy, D.L., Adler, W.H. and Smith, R.T.:
The mitogenic effects of enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes.
J. Immunol., 105, (1970), 1453-1458.

76. Bessler, W.G. and Ottenbreit, B.P.:
Studies on the mitogenic principle of the lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Res. Com., 76, (1976), 239-246.

77. Peavy, D.L., Baughn, R.E. and Musher, D.M.:
Mitogenic activity of bacterial lipopolysaccharides in vivo: Morphological and functional characterisation of responding cells.
Infect. Immun. 19, (1978), 71-78.

78. Dufer, J., Benoist, H., Choppin, J. and Desplaces, A.:
DNA synthesis and antibody production in mouse spleen cells after in vivo immunization by Escherichia coli LPS modified with Polyminxin B.
CRC Cr. Ac. Sci. D., 290, (1980), 699-701.

79. v. Jeney, N., Günther, E. and Jann, K.:
Mitogenic stimulation of murine spleen cells: Relation to susceptibility to Salmonella infection.
Infect. Immun., 15, (1977), 26-31.

80. Horsfall, D.J., Cooper, J.M.A. and Rowley, D.:
Changes in the immunoglobulin levels of the mouse gut and serum during conventionalisation and following the administration of S. thyphimurium.
Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 56, (1978), 727-735.

81. Watson, J. and Riblet, R.:
Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides.
J. Exp. Med., 140, (1974), 1147-1161.

82. Romball, C.G. and Weigle, W.O.:
Modulation of regulatory mechanisms operative in the cyclical production of antibody.
J. Exp. Med., 143, (1976), 497-510.

83. Romball, C.G. and Weigle, W.O.:
Splenic role in the regulation of immune responses.
Cell. Immunol., 34, (1977), 376-384.

84. Kelsoe, G., Isaak, D. and Cerny, J.:
Thymic requirement for cyclical idiotypic and reciprocal anti-idiotypic immune responses to a T-independent antigen.
J. Exp. Med., 151, (1980), 289-300.

85. Cerny, J. and Caulfield, M.J.:
Stimulation of specific antibody-forming cells in antigen-primed nude mice by the adoptive transfer of syngeneic anti-idiotypic T cells.
J. Immunol., 126, (1981), 2262-2266.

86. North, R.J.:
The concept of the activated macrophage.
J. Immunol., 121, (1978), 806-809.

87. Saito, K. and Suter, E.:
Lysosomal acid hydrolases in mice infected with BCG.
J. Exp. Med., 121, (1965), 727-738.

88. Root, R.K, Metcalf, J., Oshino, N. and Chance, B.:
H_2O_2 release from human granulocytes during phagocytosis.
J. Clin. Invest., 55, (1975), 945-955.

89. Drath, D.B. and Karnovsky, M.L.:
Superoxide production by phagocytic leukocytes.
J. Exp. Med., 141, (1975), 257-262.

90. Werb, Z. and Gordon, S.:
Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages.
J. Exp. Med., 142, (1975), 346-360.

91. White, R., Lin, H.-S. and Kuhn, C.:
Elastase secretion by peritoneal exudative and alveolar macrophages.
J. Exp. Med., 146, (1977), 802-808.

92. Werb, Z. and Gordon, S.:
Elastase secretion by stimulated macrophages: characterization and regulation.
J. Exp. Med., 142, (1975), 361-377.

93. Edelson, P.J., Zwiebel, R. and Cohn, Z.A.:
The pinocytic rate of activated macrophages.
J. Exp. Med., 142, (1975), 1150-1164.

94. Bianco, C., Griffin, F.M. and Silverstein, S.:
Studies of the macrophage complement receptor: alteration of receptor function upon macrophage activation.
J. Exp. Med., 141, (1975), 1278-1290.

95. Inouye, M.:
Internal standards for molecular weight determinants of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Applications to envelope proteins of Escherichia coli.
J. Biol. Chem., 246, (1971), 4834-4838.

96. Andersson, J., Melchers, F., Galanos, C.J. and Lüderitz, O.:
The mitogenic effect of lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule.
J. Exp. Med., 137, (1973), 943-953.

97. Bessler, W.G., Simon, E. and Rotering , H.:
Mitogenicity of a lipid-deficient lipoprotein from a mutant Escherichia coli strain.
Infect. Immun., 28, (1980), 813-823.

98. Bona, C., Broder, S., Dimitru, A. and Waldman, T.A.:
Polyclonal activation of human B lymphocytes by Nocardia Water Soluble Mitogen (NWSM).
Immunol. Rev., 45, (1979), 69-92.

99. Andersson, J., Coutinho, A. and Melchers, F.:
The switch from IgM to IgG secretion in single mitogen-stimulated B cell clones.
J. Exp. Med., 147, (1978), 1744-1754.

100. Galanos, C., Lüderitz, O. and Westphal, O.:
A new method for the extraction of R lipopolysaccharides.
Europ. J. Biochem., 9, (1969), 245-249.

101. Mohri, S., Watanabe, T. and Nariuchi, H.:
Studies on the immunological activities of the outer membrane protein from Escherichia coli.
Immunol., 46, (1982), 271-280.

102. Saito-Taki, T.,Tanabe, M.J., Mochizuki, H., Matsumoto, T., Nakano, M., Takada, H., Tsujimoto, M., Kotani, S., Kusumoto, S., Shiba, T., Yokogawa, K. and Kawata, S.:
Polyclonal B cell activation by cell wall preparations of gram-positive bacteria.
Microbiol. Immun., 24, (1980), 209-218.

103. Britton, S. and Möller, G.:
Regulation of antibody synthesis against Escherichia coli endotoxin. I. Suppressive effect of endogenously produced and passively transferred antibodies.
J. Immunol., 100, (1968), 1326-1334.

104. Romball, C.G. and Weigle, W.O.:
A cyclical appearance of antibody-producing cells after single injection of serum protein antigen.
J. Exp. Med., 138, (1973), 1426-1442.

105. Bona, C. and Hiernaux, J.R.:
Immune response: idiotypic anti-idiotypic network.
CRC Crit. Rev. Immunol., 2 (1981), 33-81.

106. Gershon, R.K. and Kondo, K.:
Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.
Immunol., 18, (1970), 723-737.

107. Hiernaux, J.R., Baker, P.J., Delisi, C. and Rudbach, J.A.:
Modulation of the immune response to lipopolysaccharide.
J. Immunol., 128, (1982), 1054-1058.

108. Melchers, F., von Boehmer, H. and Phillips, R.A.:
B-Lymphocyte subpopulations in the mouse. Organ distribution and ontongeny of immunoglobulin synthesizing and of mitogen-sensitive cells.
Transplant. Rev., 25, (1975), 26-58.

109. Oppenheim, J.J. and Rosenstreich, D.L.:
Mitogens in Immunobiology.
Acad. Press, (1976).

110. Kern, M.:
Differentiation of lymphoid cells: evidence for a B-cell specific serum supressor.
Immunol., 35, (1978), 57-61.

111. Nelson, D.S. and Shneider, C.N.:
Effect of normal mouse serum on mouse lymphocyte transformation in vitro.
Eur. J. Immunol., 4, (1974), 79-86.

112. Citron, M.O. and Michael, J.G.:
Regulation of the immune response to bacterial lipopolysaccharide by adherent cells.
Infect. Immun., 33, (1981), 519-522.

113. Andersson, J., Lernhardt, W. and Melchers, F.:
The purified protein derivative of Tuberculin, a B cell mitogen that distinguishes in its action resting, small cells from activated B cell blasts.
J. Exp. Med., 150, (1979), 1339-1350.

114. Miller, R.G. and Phillips, R.A.:
Separation of cells by velocity sedimentation.
J. Cell Physiol., 73, (1969), 191-202.

115. Melchers, F. and Andersson, J.:
Maturation of mitogen-activated bone marrow derived lymphocytes in the absence of proliferation.
Eur. J. Immunol., 4, (1974), 533-539.

116. Wagner, H., Hardt, C., Rouse, B.T., Röllinghoff, M., Scheurich, P. and Pfizenmaier, K.:
Dissection of the proliferative and differentiative signals controlling murine cytotoxic T-lymphocyte responses.
J. Exp. Med., 156, (1982), 1876-1881.

117. Alexander, P. and Evans, R.:
Endotoxin and double stranded RNA render macrophages cytotoxic.
Nature, London, 232, (1971), 76-78.

118. Doe, W.F. and Henson, P.:
Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. I. Cytolytic effect on tumor target cells.
J. Exp. Med., 148, (1978), 544-556.

119. La posta, V.J., Ashley, M.P. and Kotlarski, I.:
Characterization of the effector cells responsible for tumor resistance in Salmonella enteriditis 11 RX immunized mice.
Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 60, (1982), 23-39.

120. Cahill, J. and Hopper, K.E.:
Immunoregulation by macrophages: differential secretion of Prostaglandin E and Interleucin I during infection with Salmonella enteriditis.
Cell. Immunol., 67, (1982), 220-240.

7. LEBENSLAUF

Name:	Köhl, Sigrid
Geburtsdatum:	29. 11. 1956
Geburtsort:	Stuttgart
Eltern:	Walter Köhl und Marta Köhl (geb. Klöpfer)
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung:

Grundschule Beutelsbach:
April 1963 - Dezember 1966

Ernst-Heinkel-Realschule Grunbach:
bis Juli 1972
Abschluß mit der mittleren Reife

Lichtensterngymnasium Großsachsenheim:
Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife im Mai 1975

Studium:

Universität Stuttgart:
ab WS 75/76 Studium der Biologie (Diplomstudiengang)
Diplomvorprüfung im April 1978

Diplomarbeit:

Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, Abt. Beermann, Labor Stein:
Oktober 1979 bis Mai 1981:
'In vitro Transkription clonierter T-RNA-Gene mit Extrakten aus HeLa- und Drosophila-Gewebekulturzellen'

Diplom:

Universität Stuttgart:
mündliche Prüfungen in den Fächern Zoologie, Botanik, Biochemie und Immunologie im WS 80/81

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Mai 1981 bis Mai 1983 an der Universität Tübingen, Institut für Mikrobiologie II, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. G. Bessler angefertigt.

Meine akademischen Lehrer waren :

E. Allenstein, W. Beermann, W. Bessler, V. Braun, B. Bülow, F. Effenberger, E. Fluck, D. Hülser, K. Köhler, U. Kull, P. Kunze, F. Mechelke, E. Möhn, K.-W. Mundry, W. Neugebauer, H. Paus, G. Pfleiderer, S. Seybold, H. Stein, A. Wagner, S. Weiß, H. Zähner.